

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Producción Animal



**ESTUDIO DE EFICACIA DE UNA FUENTE DE
VITAMINA E NATURAL (D-A-TOCOFEROL) EN
GANADO PORCINO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Daniel Amazan

Bajo la dirección de los doctores

**Clemente José López Bote
Ana Isabel Rey Muñoz**

MADRID, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento Producción Animal

Tesis Doctoral presentada por

Daniel Amazan

PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE DOCTOR EN VETERINARIA

Bajo la dirección de los doctores: D. CLEMENTE JOSÉ LÓPEZ BOTE

DÑA. ANA ISABEL REY MUÑOZ

FDO. DANIEL AMAZAN

MADRID, 2012

D. CLEMENTE JOSÉ LÓPEZ BOTE, CATEDRÁTICO DE NUTICIÓN Y ALIMENTACIÓN ANIMAL DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID Y DÑA. ANA ISABEL REY MUÑOZ, PROFESORA TITULAR DE NUTRICIÓN Y ALIMENTACIÓN ANIMAL DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral titulada: **“Estudio de eficacia de una fuente de vitamina E natural (D- α -tocoferol) en ganado porcino”**, de la que es autor el licenciado en Veterinaria D. Daniel Amazan, ha sido realizada en el Departamento de Producción Animal, bajo la dirección conjunta de los que suscriben y cumple las condiciones exigidas para obtener el título de Doctor en Veterinaria.

VºBº: Los Directores:

Fdo: D. Clemente J. López Bote

Fdo: Dña. Ana Isabel Rey Muñoz

Madrid a..... De..... del 20.....

La presente Tesis doctoral se ha realizado mediante el apoyo de una beca otorgada por el Subprograma de Formación de Personal Investigador (FPI) concebida por el Ministerio de Ciencia e Innovación (MCI). Los trabajos experimentales y analíticos se han financiado por un proyecto CDTI Ref. IDI-20090944, desarrollado con la empresa Vitae Naturals (Talavera de la Reina, Toledo) y coordinado por PigChamPro (Segovia) en la Universidad Complutense de Madrid.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores de tesis, Dr. Clemente López Bote y Dra. Ana Isabel Rey Muñoz, ya que la dedicación y profesionalismo que han dado a este trabajo de investigación han sido extraordinario. Me parece más que justo mencionar que sin su importante apoyo esta tesis no podría haber sido una realidad, muchas gracias a los dos porque además de haberme permitido trabajar con dos grandes investigadores tuve la oportunidad de conocer a dos personas extraordinarias.

Quiero agradecer al Ministerio de Ciencia e Innovación el haberme concedido una Beca para Formación de Personal Investigador. Quisiera también agradecer a las empresas (Vitae Naturals y PigChamPro) por su inestimable colaboración, su implicación y sus múltiples aportaciones.

A la Universidad Complutense de Madrid, en especial a todo el Departamento de Producción Animal. Pero sobre todo mi sincero agradecimiento todos los compañeros y amigos con los que tuve la oportunidad de trabajar en el laboratorio de Nutrición. Mil gracias. Al Departamento de Bioquímica por las facilidades prestadas para la realización de algunas pruebas para la presente tesis en especial al Dr. José Manuel Bautista y la Dra. Patricia Marin. Al Departamento de Ciencias Animal de la Universidad Aarhus en especial a la Dra. Charlotte Lauridsen y al Dr *Søren Jensen* por haberme dado la posibilidad de desarrollar mi estancia en el prestigioso Centro de Investigación Foulum. Thank you so much for your hospitality.

A mis hermanos y toda mi familia por el gran cariño que me han dado y por el apoyo que me han brindado permanentemente.

Finalmente no podría acabar sin agradecer a los Doctores Álvaro Olivares, Beatriz Isabel Redondo, Argimiro Daza, Gustavo Cordero y Jorge Genaro Vicente por su gran apoyo y amistad de verdad que con amigos como vosotros se hace menos difícil una estancia en el extranjero como esta. Muchas gracias y espero continuar con esta amistad el resto de mi vida donde sea que esté.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN GENERAL	3
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	9
II.1.- ESTRÉS POST-DESTETE EN EL LECHÓN.....	9
II.2.- PROOXIDANTES Y ANTIOXIDANTES	11
II.3.- VITAMINA E.....	15
II.3.1.- Estructura química. Unidades.....	16
II.3.2.- Digestión, transporte y excreción de vitamina E	20
II.3.2.1.- Digestión, absorción y transporte	20
II.3.2.2.- Transporte e incorporación tisular	22
II.3.2.3.-Excreción de la vitamina E.....	25
II.3.3.- Funciones de la vitamina E.	27
II.3.3.1.- Efecto sobre la membrana celular	29
II.3.3.2.- Efecto sobre el metabolismo lipídico.	31
II.3.3.3.- Otros efectos biológicos	33
II.3.3.4.- Efecto sobre la calidad de la carne	34
II.3.4.- Estatus de vitamina E en el lechón recién nacido	34
II.3.4.1.- Transmisión de Vitamina E vía placentaria	35
II.3.4.2.-Transferencia de vitamina E a través de la leche y el calostro	37
II.3.4.3.- Vitamina E en el lechón destetado	39
II.3.5.- Recomendación de inclusión de vitamina E en el pienso para cerdos.	47
II.3.6.- Formas comerciales de vitamina E.	50
III. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS	55
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	61
IV.1.- MATERIAL	61
IV.1.1.- Reactivos	61
IV.1.2.- Aparatos.....	61
IV.1.3.- Biológicos	63
IV.2.- MÉTODOS.....	63
IV.2.1.- Ensayo 1	63
IV.2.1.1.- Objetivo.....	63
IV.2.1.2.- Diseño experimental	63
IV.2.2.- Ensayo 2	69
IV.2.2.1.- Objetivo.....	69
IV.2.2.2.- Diseño experimental	69
IV.2.3.- Ensayo 3	75
IV.2.3.1.- Objetivo.....	75
IV.2.3.2.- Diseño experimental	75
IV.2.4.- Análisis de laboratorio.....	82
IV.2.4.1.- Procedimiento de determinación del contenido en vitamina E de los piensos experimentales....	82
IV.2.4.2.- Análisis químico de los tejidos animales.	83
IV.2.4.2.1.- Métodos analíticos del tejido adiposo subcutáneo.....	83
IV.2.4.2.1.1.- Procedimiento de determinación del contenido de α -tocoferol en grasa.....	83
IV.2.4.2.2.2.- Procedimiento de determinación del perfil de ácidos grasos de la grasa subcutánea ...	84
IV.2.4.2.2.- Métodos analíticos del tejido muscular.	85
IV.2.4.2.2.1.- Procedimiento de determinación del contenido de α -tocoferol en músculo.....	85
IV.2.4.2.2.2. Determinación de los estereoisómeros del α -tocoferol en el músculo.	86
IV.2.4.2.2.3.- Procedimiento de determinación del perfil de ácidos grasos tejido muscular	87
IV.2.4.2.3.- Métodos analíticos del tejido hepático	88

IV.2.4.2.3.1.- Procedimiento de determinación del contenido de α -tocoferol en el hígado.....	88
IV.2.4.2.3.2.- Procedimiento de determinación del grado de oxidación de homogeneizados de tejido hepático por inducción.	88
IV.2.4.2.4.- Método analíticos de las secreciones y líquidos corporales.....	89
IV.2.4.2.4.1.- Procedimiento de determinación del contenido de α -tocoferol en calostro y leche.	89
IV.2.4.2.4.2.- Procedimiento de determinación del perfil de ácidos grasos en calostro y leche.....	89
IV.2.4.2.4.3.- Procedimiento de determinación del contenido de α -tocoferol en suero.	89
IV.2.4.2.4.4.- Evaluación de las actividades antioxidante del suero de los lechones	90
IV.2.4.2.5.- Método de determinación del grado de oxidación del suero por inducción.....	90
IV.2.4.2.5.1- Procedimiento de determinación de la capacidad de reducción férrica del suero (FRAP)	90
IV.2.4.2.5.2- Procedimiento de determinación de la concentración de glutatión	91
IV.2.4.2.4.4.- Procedimiento de determinación de la concentración de inmunoglobulinas en el suero de lechones.	91
IV.2.5.- Tratamiento estadístico.	92
V. RESULTADOS	95
V.1.- ENSAYO 1.....	95
V.1.1.- Acumulación de alfa-tocoferol	95
V.1.2.- Estatus oxidativo de los lechones	97
V.1.3.- Respuesta inmune de lechones	98
V.2.- ENSAYO 2.....	101
V.2.1.- Rendimientos productivos de los lechones.....	101
V.2.2.- Acumulación de alfa-tocoferol en diferentes tejidos.....	101
V.2.3.- Perfil de ácidos grasos en tejidos en secreciones	102
V.2.4.- Estatus oxidativos de los lechones.....	102
V.2.5.- Respuesta inmune de los lechones	103
V.3.- ENSAYO 3.....	113
V.3.1.- Rendimientos productivos de los lechones.....	113
V.3.2.- Acumulación de alfa-tocoferol en diferentes tejidos.....	113
V.3.2.1.- Distribución relativa de estereoisómeros de α -tocoferol	114
V.3.3.- Perfil de ácidos grasos en tejidos y en secreciones.....	119
V.3.4.- Estatus oxidativos de los lechones.....	121
V.3.5.- Respuesta inmune de los lechones	122
VI. DISCUSIÓN	131
VI.1.- ENSAYO 1	131
VI.2.1.- Rendimientos productivos de cerdas y lechones	131
VI.2.2.- Acumulación de tocoferoles.	132
VI.2.3.- Estatus oxidativo de los lechones.....	137
VI.2.4.- Respuesta inmune de los lechones.....	139
VI.1.- ENSAYO 2 Y 3	141
VI.1.1.- Rendimientos productivos de lechones	142
VI.1.2.- Acumulación de tocoferol.....	144
VI.1.2.1.- Distribución relativa de estereoisómeros de alfa-tocoferol	149
VI.1.3.- Estatus oxidativo de los lechones.....	150
VI.1.4.- Respuesta inmune de los lechones.....	152
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	157
VIII. CONCLUSIONES	179

ÍNDICE DE LAS TABLAS

TABLA II-1.- TRASTORNOS DEGENERATIVOS ASOCIADOS CON EL DAÑO OXIDATIVO.....	11
TABLA II-2.- ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS Y NO ENZIMÁTICOS. (LAURIDSEN, 1998).....	14
TABLA II-3.- CONTENIDO EN VITAMINA E DE ALGUNOS ACEITES VEGETALES (MG/KG). (BASF, 1991)	16
TABLA II-4.- ACTIVIDAD BIOLÓGICA RELATIVA DE LOS DIFERENTES ISÓMEROS DE LA VITAMINA E (BRIGELIUS-FLOHE Y TRABER, 1999).....	19
TABLA II-5.- ACTIVIDAD BIOLÓGICA RELATIVA DE LAS DIFERENTES FORMAS DE LOS TOCOFEROLES (ADAPTADO A PARTIR DE BENDER, 2003)	51
TABLA II-6.- ACTIVIDAD BIOLÓGICA RELATIVA DE LAS DIFERENTES FORMAS DE LOS TOCOTRIENOLES (ADAPTADO A PARTIR DE BENDER, (2003)	51
TABLA II-7.- ACTIVIDAD BIOLÓGICA RELATIVA DE LAS DIFERENTES FORMAS DE α -TOCOFEROL ADAPTADO A PARTIR DE (BENDER 2003).....	52
TABLA IV-1.- CONSUMO DIARIO DE VITAMINA E SINTÉTICA (ACETATO DE ALL-RAC-ALFA-TOCOFEROL) EN EL PIENSO Y NATURAL (ALFA-TOCOFEROL SOLUBLE) EN EL AGUA DE BEBIDA DE LAS CERDAS EXPERIMENTALES DURANTE LA LACTACIÓN.	64
TABLA IV-2.- INGREDIENTES (%) Y COMPOSICIÓN CALCULADA DE LOS PIENSOS ADMINISTRADOS A LAS CERDAS DURANTE LA LACTACIÓN	65
TABLA IV-3.- INGREDIENTES (%) Y COMPOSICIÓN CALCULADA DE LOS PIENSOS ADMINISTRADOS A LOS LECHONES DESDE EL DESTETE A LOS 42 DÍAS DE EDAD.	67
TABLA IV-4.- CONSUMO DIARIO DE VITAMINA E SINTÉTICA (ACETATO DE ALL-RAC-ALFA-TOCOFEROL) EN EL PIENSO Y NATURAL (ALFA TOCOFEROL SOLUBLE) EN EL AGUA DE BEBIDA DE LAS CERDAS EXPERIMENTALES DURANTE LA LACTACIÓN.....	70
TABLA IV-5.- INGREDIENTES (%) Y COMPOSICIÓN CALCULADA DE LOS PIENSOS ADMINISTRADOS A LAS CERDAS DURANTE LA GESTACIÓN Y LACTACIÓN	71
TABLA IV-6.- INGREDIENTES (%) Y COMPOSICIÓN CALCULADA DE LOS PIENSOS ADMINISTRADOS A LOS LECHONES DESDE EL DESTETE (28 DÍAS) A 42 DÍAS DE EDAD.....	73
TABLA IV-7 -. CONSUMO DIARIO DE VITAMINA E SINTÉTICA (ACETATO DE ALL-RAC-A-TOCOFEROL) EN EL PIENSO Y NATURAL (ALFA TOCOFEROL SOLUBLE) EN EL AGUA DE BEBIDA DE LAS CERDAS EXPERIMENTALES DURANTE LA LACTACIÓN.....	75
TABLA IV-8- -. INGREDIENTES (%) Y COMPOSICIÓN CALCULADA DE LOS PIENSOS ADMINISTRADOS A LAS CERDAS DURANTE LA GESTACIÓN Y LACTACIÓN.	77
TABLA IV-9 - INGREDIENTES (%) Y COMPOSICIÓN CALCULADA DE LOS PIENSOS ADMINISTRADOS A LOS LECHONES DESDE EL DESTETE (28 DÍAS) A 42 DÍAS DE EDAD.....	79
TABLA IV-10 -. TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES EN FUNCIÓN DE LA ADMINISTRACIÓN DE VIT E SINTÉTICA O NATURAL (VITAPHEROLE EP 1000/50) EN LAS FASES DE LACTACIÓN (A SUS MADRES) Y LECHONES. LA CANTIDAD DE VITAMINA E NATURAL SE INCORPORÓ A UN RATIO 1/2 O 1/3 RESPECTO A LA CANTIDAD DE VITAMINA E SINTÉTICA QUE SE APORTÓ EN CADA FASE.	80
TABLA IV-11-. CONSUMO DIARIO DE VITAMINA E SINTÉTICA (ACETATO DE ALL-RAC-ALFA-TOCOFEROL) EN EL PIENSO Y NATURAL (ALFA TOCOFEROL SOLUBLE) EN EL AGUA DE BEBIDA DE LOS LECHONES DURANTE EL PERIODO DE DESTETE....	81
TABLA V-1 - CONCENTRACIONES DE ALFA-TOCOFEROL DEL SUERO Y DE LA LECHE (μ G/G) DE CERDAS QUE CONSUMIERON ALFA-TOCOFEROL EN EL AGUA DE BEBIDA (SUPLEMENTADAS) VERSUS CONTROL.	95
TABLA V-2 - FRAP DEL SUERO (CAPACIDAD REDUCTORA DEL HIERRO SÉRICO) DE LOS LECHONES QUE CONSUMIERON LA DIETA EXPERIMENTAL ¹	98
TABLA V-3 - CONCENTRACIÓN DE LA FORMA OXIDADA (GSSH) Y REDUCIDA DE GLUTATIÓN (GSH) EN SUERO DE LECHONES.	99
TABLA V-4 - INMUNOGLOBULINAS (MG/ML) DEL SUERO DE LECHONES EN FUNCIÓN DEL APORTE DE VITAMINA E.....	100
TABLA V-5 - PARÁMETROS ZOOTÉCNICOS DE LOS LECHONES ENTRE LOS 28-42 DÍAS EN FUNCIÓN DEL APORTE DE VITAMINA E A LA CERDA.....	105
TABLA V-6 - CONCENTRACIÓN DE ALFA-TOCOFEROL (μ G/ML) DEL SUERO, CALOSTRO Y LECHE DE LAS CERDAS Y DEL SUERO DEL LECHÓN EN FUNCIÓN DEL APORTE DE VITAMINA E A LA CERDA.....	106
TABLA V-7- COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS (%) DEL CALOSTRO DE LA CERDA SEGÚN EL APORTE DE VITAMINA E A DE LA CERDA	107

TABLA V-8 - COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS (%) DE LA LECHE DE LA CERDA A LOS 7 DÍAS DE LACTACIÓN SEGÚN EL APOORTE DE VITAMINA E A LA CERDA	108
TABLA V-9 - COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS (%) DE LA LECHE DE LA CERDA A LOS 27 DÍAS DE LACTACIÓN SEGÚN EL APOORTE DE VITAMINA E A LA CERDA	109
TABLA V-10 - CAPACIDAD REDUCTORA DEL HIERRO PLASMÁTICO (FRAP) Y CONCENTRACIÓN DE MDA EN SUERO DE LECHONES SEGÚN EL APOORTE DE VITAMINA E A LA CERDA.	110
TABLA V-11 - INMUNOGLOBULINAS (MG/ML) DEL SUERO DE LECHONES EN FUNCIÓN DEL APOORTE DE VITAMINA E A LA CERDA.	111
TABLA V-12 - PARÁMETROS ZOOTÉCNICOS DE LOS LECHONES EN FUNCIÓN AL APOORTE DE VITAMINA E DEL LECHÓN ENTRE LOS 28-42 DÍAS DE EDAD.	115
TABLA V-13 - CONCENTRACIÓN DE ALFA-TOCOFEROL (μG/ML) EN EL SUERO, CALOSTRO Y LECHE DE CERDAS DURANTE LA GESTACIÓN Y LACTACIÓN Y EN EL SUERO DE LOS LECHONES HASTA EL DESTETE (28 DÍAS).	116
TABLA V-14 - ACUMULACIÓN DE ALFA-TOCOFEROL (μG/G) EN LOS TEJIDOS DE LOS LECHONES AL SACRIFICIO (39 DÍAS) EN FUNCIÓN DEL APOORTE DE VITAMINA E A LA CERDA Y LECHÓN.....	117
TABLA V-15 - COMPOSICIÓN EN ESTEREOISÓMEROS DE ALFA-TOCOFEROL (%) DEL MÚSCULO DE LECHONES A LOS 39 DÍAS EN FUNCIÓN DEL APOORTE DE VITAMINA E A LA CERDA Y LECHÓN.....	117
TABLA V-16 - COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS (%) DEL CALOSTRO Y LECHE DE LA CERDA A LOS 28 DÍAS DE LACTACIÓN..	119
TABLA V-17 - COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS (%) DE LA LECHE DE LA CERDA A LOS 28 DÍAS DE LACTACIÓN.....	120
TABLA V-18 - COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS (%) DE LA GRASA SUBCUTÁNEA DE LECHONES A 39 DÍAS DE EDAD EN FUNCIÓN DEL APOORTE DE VITAMINA E A LA CERDA O AL LECHÓN DESTETADO.	123
TABLA V-19 - COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS (%) DEL MÚSCULO DE LECHONES A 39 DÍAS DE EDAD EN FUNCIÓN DEL APOORTE DE VITAMINA E A LA CERDA Y EL LECHÓN.	124
TABLA V-20 - CAPACIDAD REDUCTORA DEL HIERRO SÉRICO (FRAP) Y GLUTATIÓN TOTAL, OXIDADO O REDUCIDO EN SUERO Y MÚSCULO DE LECHONES DE 39 DÍAS DE EDAD.	125
TABLA V-21 - CONCENTRACIÓN DE MDA (μM) OBTENIDA POR OXIDACIÓN INDUCIDA POR HIERRO DEL SUERO DE LECHONES A 39 DÍAS DE EDAD.	125
TABLA V-22 - CONCENTRACIÓN DE MDA (μM/G) OBTENIDA POR OXIDACIÓN INDUCIDA CON HIERRO DEL TEJIDO HEPÁTICO DE LECHONES A 39 DÍAS DE EDAD EN FUNCIÓN DEL APOORTE DE VITAMINA E.	126
TABLA V-23 - CONCENTRACIONES DE INMUNOGLOBULINAS (MG/ML) DEL SUERO DE LECHONES DESDE EL DÍA 2 AL 28 DE VIDA EN FUNCIÓN DEL APOORTE DE VITAMINA E A LA CERDA.	127
TABLA V-24 - CONCENTRACIONES DE INMUNOGLOBULINAS (MG/ML) DEL SUERO DE LECHONES EN FUNCIÓN DEL APOORTE DE VITAMINA E DE LA CERDA O AL LECHÓN.	128

ÍNDICE DE LAS ILUSTRACIONES

ILUSTRACIÓN II-1. PRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS SISTEMAS PRO Y ANTI-OXIDANTE (BARBOSA ET AL. 2008).	10
ILUSTRACIÓN II-2.- ESTRUCTURA DEL TOCOFEROL Y TOCOTRIENOL. LA ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA VITAMINA E SE CARACTERIZA POR TENER UN ANILLO CROMANOL SOSTENIDO POR UNA CADENA LATERAL ALIFÁTICA HIDROFÓBICA (C16) QUE SEGÚN QUE ESTE SATURADA O INSATURADA SE TRATA DE TOCOFEROL O TOCOTRIENOL RESPECTIVAMENTE HACQUEBARD ET AL. (2008).	17
ILUSTRACIÓN II-3. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL ALFA-TOCOFEROL NATURAL (BRIGELIUS-FLOHE Y TRABER 1999).	17
ILUSTRACIÓN II-4.- ESTEREOISOMEROS DEL ALFA-TOCOFEROL	18
ILUSTRACIÓN II-5.- ABSORCIÓN INTESTINAL. LA FORMA ESTERIFICADA DE TOCOFEROL (TE) ES HIDROLIZADO EN EL LUMEN INTESTINAL Y ABSORBIDO EN SU FORMA ALCOHOL (TOCOFEROL TOH) POR LOS ENTEROCITOS. EL TOH NO ESTERIFICADO SE INCORPORA EN LOS QUILOMICRONES (CM), QUE LLEGAN A LA CIRCULACIÓN A TRAVÉS DE LA LINFIA INTESTINAL. LOS QUILOMICRONES REMANENTES (CMR) SE FORMAN BAJO LA ACCIÓN DE LA LIPOPROTEÍNA LIPASA (LPL), QUE HIDROLIZA LOS TRIGLICÉRIDOS. DURANTE ESTE PROCESO, PARTE DEL TOH ASOCIADO A CM ES TRANSFERIDO A LOS TEJIDOS PERIFÉRICOS. SIN EMBARGO, LA MAYORÍA PERMANECE EN LOS QUILOMICRONES REMANENTES (CMR) LOS CUALES TERMINAN POR SER INCORPORADOS AL HÍGADO (A PARTIR DE DEBIER Y LARONDELLE, 2005).....	21
ILUSTRACIÓN II-6.- ALMACENAMIENTO DE VITAMINA E. LOS QUILOMICRONES REMANENTES (CMR), QUE CONTIENEN TOCOFEROL (TOH) SON ABSORBIDOS POR LAS CÉLULAS PARÉNQUIMATOSAS DEL HÍGADO. EN EL INTERIOR DEL HÍGADO, EL ALFA-TOCOFEROL ES PREFERENTEMENTE INCORPORADO EN LAS LIPOPROTEÍNAS DE MUY BAJA DENSIDAD (VLDL), DEBIDO A LA UNIÓN SELECTIVA A UNA PROTEÍNA DE TRANSPORTE CELULAR ESPECÍFICA, LA PROTEÍNAS TRANSPORTADORA DE ALFA-TOCOFEROL (ALFA-TTP) (DEBIER Y LARONDELLE, 2005; TRABER ET AL., 2004).	23
ILUSTRACIÓN II-7.- TRANSPORTE E INCORPORACIÓN TISULAR. EL TOCOFEROL (TOH) CIRCULA ASOCIADO A LOS QUILOMICRONES (CM). UNA PEQUEÑA PARTE SE INCORPORA EN LOS TEJIDOS EXTRA-HEPÁTICOS SIGUIENDO LA ACCIÓN DE LA LIPOPROTEÍNA LIPASA (LPL), MIENTRAS QUE EL HÍGADO ABSORBE EL RESTO DE LOS REMANENTES DE QUILOMICRONES (CMR). EL ALFA-TOCOFEROL DEL HÍGADO ES SECRETADO A LA CIRCULACIÓN ASOCIÁNDOSE CON VLDL. DURANTE ESTE PROCESO DE LIPOLISIS, PARTE DE LOS TOH SE TRANSFIERE A LOS TEJIDOS PERIFÉRICOS O A LA HDL. EL RESTO DEL TOH TERMINA EN LA LIPOPROTEÍNA LDL, Y TAMBIÉN SE TRANSFIERE A LOS TEJIDOS PERIFÉRICOS ASÍ COMO A LAS CÉLULAS PARENQUIMATOSAS DEL HÍGADO A TRAVÉS DE LA VÍA DEL RECEPTOR DE LDL (DEBIER Y LARONDELLE, 2005; TRABER ET AL., 2004).	25
ILUSTRACIÓN II-8.- EXCRECIÓN BILIAR DE LA VITAMINA E. ESQUEMA DE CAPTACIÓN DE QUILOMICRONES REMANENTES, LA HIDRÓLISIS Y LA SÍNTESIS DE VLDL (TRABER ET AL., 2004).....	26
ILUSTRACIÓN II-9.- CUANTIFICACIÓN DEL NIVEL DAÑOS DEL DNA EN SUJETOS SUPLEMENTADOS CON VITAMINA E.....	27
ILUSTRACIÓN II-10.- ESQUEMA DE REACCIÓN DE LA VITAMINA E CON UN RADICAL LIBRE (MUSTACICH ET AL 2007).	28
ILUSTRACIÓN II-11.- ESQUEMA DE REGENERACIÓN DE LA VITAMINA E CON PARTICIPACIÓN DE LA VITAMINA C (MUSTACICH ET AL 2007).	29
ILUSTRACIÓN II-12.- ESQUEMA DE INTERACCIÓN DE LA VITAMINA E (RIMBACH ET AL., 2002)	31
ILUSTRACIÓN II-13.- CONCENTRACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS EN CALOSTRO (ANTES DE LA SUCCIÓN) Y LECHE (24 HORAS DESPUÉS DEL NACIMIENTO) (A PARTIR DE LE DIVIDICH ET AL., 2005).	33
ILUSTRACIÓN II-14.- CONCENTRACIÓN DE VITAMINA E EN SUERO DE CERDAS EN EL DIA 103 DE GESTACIÓN, EN LECHONES, EN PLACENTA Y RATIO DE TRANSFERENCIA PLACENTARIA EN FUNCIÓN DEL NIVEL DE INCLUSIÓN DE VITAMINA E EN EL PIENSO (CONTROL: 36MG/KG DE PIENSO; E200: 200MG/KG DE PIENSO Y E400: 400MG/KG DE PIENSO) (PINELLI-SAAVEDRA Y SCAIFE, 2005).....	37
ILUSTRACIÓN II-15.- EVOLUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE VITAMINA E EN LECHE, PLASMA DE LA MADRE Y DE SU PROGENIE A LO LARGO DE LA LACTACIÓN, EN FUNCIÓN DEL NIVEL DE ENRIQUECIMIENTO CON VITAMINA E DEL PIENSO DE LAS CERDAS (A PARTIR DE LAURIDSEN, 2002 Y LAURIDSEN Y JENSEN, 2005)	39
ILUSTRACIÓN II-16.- ESQUEMA DEL PROCESO DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE LA VITAMINA E.	41
ILUSTRACIÓN II-17.- CONCENTRACIÓN DE DE α -TOCOFEROL EN EL SUERO SANGUÍNEO DE LECHONES DESTETADOS SEGÚN LA CONCENTRACIÓN DE VITAMINA E EN EL PIENSO (ENTRE 0 Y 200 UI/KG) (MOREIRA Y MAHAN, 2002)	43

ILUSTRACIÓN II-18.- CONCENTRACIÓN DE α -TOCOFEROL EN EL SUERO SANGUÍNEO DE LECHONES DESTETADOS SEGÚN LA CONCENTRACIÓN DE VITAMINA E EN EL PIENSO (85, 150 Y 300 UI/KG) DESDE EL DESTETE (D28) HASTA EL DÍA 56 DE EDAD (A PARTIR DE LAURIDSEN, 2010)	43
ILUSTRACIÓN II-19.- EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE VITAMINA E (20 VS 60 UI/KG PIENSO) Y LA INCLUSIÓN DE GRASA AÑADIDA EN EL PIENSO DE LECHONES DESTETADOS EN LA CONCENTRACIÓN α -TOCOFEROL EN EL SUERO SANGUÍNEO. (MOREIRA Y MAHAN, 2002.)	45
ILUSTRACIÓN II-20.- EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE VITAMINA E EN EL PIENSO DE CERDAS REPRODUCTORAS EN LA CONCENTRACIÓN DE α -TOCOFEROL EN EL HÍGADO DE LECHONES DESTETADOS (LAURIDSEN Y JENSEN, 2005).	46
ILUSTRACIÓN II-21.- SÍNTESIS DEL DL-ALL-RAC- α -TOCOFEROL	52
ILUSTRACIÓN IV-1 - CROMATOGRAMA DEL ANÁLISIS DE ALFA-TOCOFEROL EN PIENSO	83
ILUSTRACIÓN IV-2.- CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS DE ESTEREOISÓMEROS	87
ILUSTRACIÓN V-1 - CONCENTRACIÓN DE ALFA-TOCOFEROL EN LA LECHE DE LAS MADRES	96
ILUSTRACIÓN V-2 - CONCENTRACIÓN DE ALFA-TOCOFEROL DEL SUERO (μ G/G) DE LECHONES A LO LARGO DEL EXPERIMENTO.	97
ILUSTRACIÓN V-3 - EVOLUCIÓN DE TOCOFEROL DE LAS MADRES DESDE LOS 7 DÍAS ANTES DEL PARTO HASTA EL DESTETE.	113
ILUSTRACIÓN VI-1 - CONCENTRACIÓN DE ALFA-TOCOFEROL EN EL SUERO DE LAS CERDAS REPRODUCTORAS Y LECHONES EN EL DÍA 28 DE LACTACIÓN.	133
ILUSTRACIÓN VI-3 - VALOR FRAP EN SUERO DE LECHONES A LAS DOS SEMANAS DEL DESTETE. (M= MADRE, L= LECHÓN, CTROL= GRUPO QUE NO RECIBIÓ SUPLEMENTO DE VITAMINA E NATURAL, SUP NAT= GRUPO SUPLEMENTADO CON VITAMINA E NATURAL EN EL AGUA DE BEBIDA)	138
ILUSTRACIÓN VI-4 - ESTUDIO COMPARATIVO DEL PESO VIVO (PV) AL DESTETE (28D) Y A LOS 42 DÍAS DE VIDA EN EL EXPERIMENTO 2 Y 3. (DATOS EXPRESADOS EN PORCENTAJE SOBRE UN VALOR DE 100 PARA EL GRUPO CONTROL)	143
ILUSTRACIÓN VI-5 - ESTUDIO COMPARADO DEL EFECTO DEL APOORTE DE α -TOCOFEROL A LAS MADRES EN LA CONCENTRACIÓN DE α -TOCOFEROL (μ G/ML) EN EL SUERO DE LAS MADRES, EN EL CALOSTRO Y EN LA LECHE (ENSAYOS 2 Y 3)	145
ILUSTRACIÓN VI-6 - ESTUDIO COMPARADO EN LOS TRES EXPERIMENTOS DEL APOORTE DE α -TOCOFEROL A LAS MADRES Y LECHONES DESTETADOS EN LA CONCENTRACIÓN DE α -TOCOFEROL (μ G/ML) EN EL SUERO DE LECHONES EN DESTETE Y POST-DESTETE (ENSAYOS 2 Y 3). (DATOS EXPRESADOS EN PORCENTAJE SOBRE UN VALOR DE 100 PARA EL GRUPO CONTROL)	146
ILUSTRACIÓN VI-7 - EFECTO DEL APOORTE DE FORMA NATURAL O SINTÉTICA DE ALFA-TOCOFEROL A LA MADRE O EL LECHÓN DESTETADO EN LA PROPORCIÓN DEL ESTEREOISÓMERO (%) RRR EN EL TEJIDO MUSCULAR DEL LECHÓN A LOS 39 DÍAS DE VIDA (EXPERIMENTO 3)	150
ILUSTRACIÓN VI-8 - ESTUDIO COMPARADO DEL ESTATUS OXIDATIVO EN EL SUERO DE LECHONES (ESTIMADO COMO VALOR FRAP O COMO CONCENTRACIÓN DE MALONDIALDEHIDO) EN LOS ENSAYOS 2 (IZQUIERDA) Y 3 (DERECHA). PARA FACILITAR LA COMPARACIÓN ENTRE LOS DOS EXPERIMENTOS, EN LA FIGURA CENTRAL SE MUESTRAN LOS GRUPOS DEL EXPERIMENTO 3 QUE RECIBIERON DIFERENTE ALIMENTACIÓN EN LA ETAPA DE MADRE, PERO QUE EN LA ETAPA DE LECHÓN RECIBIERON ÚNICAMENTE VITAMINA E EN FORMA SINTÉTICA. EN TODOS LOS CASOS SE EXPRESA EN PORCENTAJE RESPECTO AL GRUPO CONTROL QUE SIEMPRE RECIBE LA FORMA SINTÉTICA DE VITAMINA E.....	151

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

La producción mundial de carne de porcino presenta una elevada concentración, pues sólo China acaparó casi el 50% del volumen total producido en 2009 (102.6 millones de toneladas). EEUU, Alemania y España, con cuotas más modestas (del 10,2%, 5,1% y 3,2% respectivamente), ocuparon las siguientes posiciones. Sin embargo, estas cifras no dan una idea real de la importancia proporcional del sector porcino en cada país, ya que existen grandes diferencias en tamaño y población entre los países. Si se cuantifica esta producción respecto a la población en cada uno de esos países es interesante observar que China pierde bastante peso y el primer puesto lo ocupa Dinamarca, con más de 285 kg de carne por persona. En un segundo nivel productivo (entre 50 y 100 kg) se encuentran Bélgica, Países Bajos, España y Alemania.

Estas diferencias en el potencial productivo hacen que entre los cinco mayores exportadores, cuatro sean países europeos (Dinamarca, Alemania, Bélgica y España) y que, junto con EEUU aglutinen casi el 70% de las ventas mundiales en 2007.

La fortaleza del sector porcino en España y su alta competitividad se refleja en la tasa de autoabastecimiento que se estima en el 145%. Según datos oficiales del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (2012) en el año 2008 se sacrificaron en España 41,3 millones de cerdos, lo que supone aproximadamente 3.48 millones de Tm de canales, de las cuales se exportaron 1.25 millones de Tm. Globalmente el consumo de carne anual per cápita se estima en 52 kg, lo que equivale aproximadamente a la mitad del consumo total de carne. La mayor parte de las exportaciones se producen dentro de la Unión Europea, representado dentro de ella Francia (31.5 Tm), Portugal (12.4 Tm), Italia (12.2 Tm) y Alemania (6.8 Tm) los principales destinos (31, 21, 12 y 10% respectivamente). Fuera del ámbito comunitario los principales destinos en 2008 fueron Rusia, Hong-kong, Corea del Sur y Japón.

En Latinoamérica los mayores consumidores de la carne de cerdo son Brasil y México, este último con un 1.8 % del consumo a nivel Mundial (USDA y Comisión de la Unión Europea, 2009).

Una de las características de la producción porcina en España es la importancia de la industria transformadora. De acuerdo con la Asociación de Industrias de la Carne Española (AICE), de los 1,25 millones de toneladas producidos por la industria en 2009, el 48% eran jamones y paletillas cocidas y curadas, así como embutidos curados. En términos de valor, el producto con mayor cotización en el mercado es el jamón curado, que supone el 19,5% de la producción física y el 34,5% de la económica, lo que contrasta con los fiambres, que acaparan el 18,5% del volumen y sólo el 12,5% del valor.

Las exportaciones de carne de porcino en volumen durante el periodo 2000-2010 han registrado un crecimiento acumulado del 167,6%, mientras que las importaciones han descendido un 3,4%. En términos monetarios, el periodo arrancó con unas exportaciones de 591,3 millones de euros, que fueron creciendo a un ritmo medio anual del 11,5% hasta situarse en 1.761,5 millones de euros en 2010.

Todos estos datos indican la importancia del sector porcino en España, no solo en lo referente a la producción, sino a la transformación. Se trata de un sector estratégico en la economía nacional que exige un importante esfuerzo innovador tanto en lo referente a los aspectos productivos como a los relacionados con la calidad de las producciones. En términos generales la investigación y el desarrollo tecnológico en España en el sector porcino es de bastante calidad, habiendo aumentado considerablemente en los últimos 15 años. El área más activa es la relacionada con la calidad de la carne y los productos derivados, pero también el área de la producción/alimentación (particularmente en lo relativo a cerdos de cebo) y de la Sanidad puede considerarse competitiva a nivel internacional a juzgar por el número de publicaciones y el impacto de las mismas..

Debido a la importancia del sector ibérico y a su escasa prolificidad en comparación con otras razas, el censo de reproductoras porcinas en España es proporcionalmente más elevado de lo que cabría esperar, ocupando el primer lugar de la UE-27 con 2,531 millones

de cerdas. Sin embargo, el área de investigación relacionada con la alimentación de cerdas y la transferencia de nutrientes a lechones durante la etapa inicial de vida es proporcionalmente un área poco desarrollada en España. Ello se debe probablemente a las dificultades trabajar en un sector que demanda una infraestructura compleja y extremadamente cara para conseguir resultados experimentales fiables. Esta tesis doctoral se centra en esta etapa productiva y presta especial atención al aporte de vitaminas antioxidantes (vitamina E) en diferentes formas de presentación.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1.- Estrés post-destete en el lechón

La etapa del destete es sin duda una de las más delicadas en la vida del cerdo. El elevado potencial productivo de los genotipos porcinos (alta tasa de crecimiento, alta prolificidad, etc) y la elevada presión para reducir costes productivos implica la necesidad de llevar a cabo destetes tempranos. Mientras el lechón está con la madre, el consumo de alimento sólido es pequeño y su crecimiento depende fundamentalmente de la producción láctea. Durante los primeros días que siguen al nacimiento, el crecimiento es moderado y la madre tiene capacidad suficiente para proporcionar los nutrientes necesarios a la camada, pero el potencial de crecimiento de los lechones aumenta de una forma progresiva, llegando a un momento (entre los 21 y 28 días de vida) en los que la madre tiene serias dificultades para alimentar a la camada sin comprometer en exceso su viabilidad y supervivencia como reproductora. La elección del momento del destete debe establecerse por tanto teniendo en cuenta la capacidad de la madre de soportar todo el potencial productivo de la camada y la capacidad del lechón para desarrollarse independientemente. En esta decisión entran en juego muchos factores técnicos y consideraciones éticas de los animales, pero en cualquier caso supone para el lechón la confluencia de toda una serie de factores estresantes (separación de la madre, cambio de ubicación, mezclas, peleas, inadaptación térmica, transición al alimento sólido, agresión microbiana, escasa apetencia, etc.) en los días inmediatamente posteriores al destete (Whittemore, 1993). El estrés genera un desequilibrio en el delicado equilibrio oxidativo del lechón, que además no dispone de mecanismos suficientes para contrarrestarlo.

El estrés en los lechones se puede resumir en un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (Avellini et al., 1999) y la defensa antioxidante, provocando así daños celulares. Los principales síntomas que caracterizan esta delicada etapa de la vida del lechón se resumen en un bajo consumo de alimento pero curiosamente se mantiene el consumo de agua (Wilbum et al., 2008) y por consiguiente carencias en los nutrientes

esenciales, debilidad y pérdida de peso. En esta etapa suelen aparecer muchas enfermedades infecciosas sobre todo entéricas que aprovechan de la debilidad del sistema inmune del animal y puede producirse incluso muerte súbita por deshidratación. El cuerpo, bajo condiciones fisiológicas suele tener agentes anti-oxidantes suficientes para hacer frente a los radicales libres. No obstante cuando la generación de radicales libres excede la capacidad anti-oxidante de la células o de los fluidos extracelulares se produce lo que llamamos el estrés oxidativo (Avellini et al., 1999). Durante el estrés oxidativo, se producen una serie de productos, los llamados radicales libres que son muy reactivos con moléculas que contienen uno o más electrones no apareados (Alvarado et al. 2006) y que pueden tener consecuencias pésimas a nivel celular. Los radicales libres o especies reactivas (Archille-Contrera y Purslow, 2010) dañan a los componentes celulares causando alteraciones en los lípidos, proteínas, DNA, etc, que pueden iniciar una cadena de eventos que provocan lesión celular. Evitar el estrés en los lechones destetados, con todos los efectos que pueda traer consigo lo más pronto posible es por tanto sumamente importante.

Ilustración II-1. Presentación esquemática de los sistemas pro y anti-oxidante (Barbosa et al. 2008).



Tabla II-1.- Trastornos degenerativos asociados con el daño oxidativo

Cancer
Cardiovascular disease
Stroke
Cataract
Degeneration of the macular area of the retina
Immunosenescence
Ageing

Fuente: (Hughes, 1999). Esta tabla ilustra los daños degenerativos que puede ocasionar el estrés oxidativo

II.2.- Prooxidantes y antioxidantes

Entre los principales factores prooxidantes o especies reactivas de oxígeno cabe destacar el anión superóxido, peróxido de hidrógeno, óxido nitroso, dióxido nitroso; los radicales hidroxilos, peroxilo, alcoxilo e hidroxiperoxilo y algunos metales de transición como el hierro y el cobre (Formanek et al., 1998). Como ya hemos indicado, cuando su actividad en el organismo animal es superior a la capacidad antioxidante pueden verse comprometidas la estructura y funcionalidad de multitud de biomoléculas, lo que puede condicionar la presencia de alteraciones entre las que cabe destacar la integridad de las membranas celulares, la integridad del ADN (mutagénesis y programación de muerte celular) y la respuesta inmune. Además se produce un grave deterioro de la calidad de la carne y los productos cárnicos como consecuencia de la peroxidación lipídica, con génesis de sabores y olores anómalos, y por otra parte disminuye la capacidad de retención de agua.

La mayoría de las biomoléculas presentes en el organismo animal pueden ser oxidadas por los factores prooxidantes (Bandyopadhyay et al., 1999); sin embargo las macromoléculas biológicas más susceptibles son los lípidos (Halliwell, 1993). La peroxidación lipídica es un proceso que ha sido ampliamente estudiado. Es conocido que en el organismo vivo puede producirse bajo control enzimático o no enzimático; siendo esta última forma la que se relaciona con el estrés oxidativo y por tanto con el daño celular.

La estructura básica de las membranas biológicas es la bicapa lipídica, que funciona como una barrera de permeabilidad selectiva. Dichas membranas poseen ácidos grasos poliinsaturados que son bastante vulnerables a la acción de las especies reactivas del

oxígeno. Generalmente la peroxidación lipídica es inducida por un radical hidroxilo que sustrae un hidrógeno a la cadena lateral del ácido graso formando un radical carbonado. Este último reacciona con oxígeno para formar peróxidos cíclicos y radicales hidroperóxidos que propagan la reacción en cadena ya que ataca a otros ácidos grasos poliinsaturados e inicia nuevas reacciones de oxidación. La presencia de metales de transición como el hierro o el cobre así como los dobles enlaces presentes en los ácidos grasos favorecen esta reacción (Formanek et al., 1998). Los productos finales de la peroxidación lipídica son nuevos radicales libres y compuestos citóxicos entre los que cabe destacar los aldehídos (Romero y Roche, 1998). Las consecuencias de la alteración de la estructura química de los ácidos grasos poliinsaturados son más evidentes cuanto éstos forman parte de las membranas celulares, ya que se produce una alteración de la cohesión, fluidez, permeabilidad y función metabólica (Yu, 1994).

En relación a las proteínas, se ha observado que la presencia significativa en su estructura de aminoácidos aromáticos o sulfurados las hace más susceptibles de sufrir daños oxidativos (Formanek et al., 1998). No obstante, su acción es menos problemática que en el caso de los lípidos, debido al lento progreso de las reacciones. Es importante considerar que las proteínas sufren alteraciones localizadas en los sitios ligados a metales de transición, ya que éstos reaccionan fácilmente con el peróxido de hidrógeno formándose así iones hidroxilos capaces de atacar a los aminoácidos adyacentes. Entre los grupos de aminoácidos más susceptibles a sufrir el ataque de los radicales libres se encuentran la fenilalanina, tirosina, histidina y metionina. Además, como consecuencia de la oxidación es frecuente que se produzca el entrecruzamiento de cadenas peptídicas. Todo ello tiene una gran trascendencia en aquellos procesos biológicos en los que juegan un papel fundamental las proteínas, como es el caso de la alteración del sistema de transporte celular mediado por la enzima calcioATPasa, encargada de mantener el gradiente de iones calcio, ya que dicha enzima contiene grupos tioles que pueden ser inactivados por las especies reactivas al oxígeno. Cuando esto ocurre, se pierde la actividad catalítica de la enzima y se modifica la homeostasis del calcio, lo que produce la activación de proteasas, que atacan al citoesqueleto celular, y de nucleasas que fragmentan el ADN (Halliwell, 1992), siendo ésta

una de las principales causas de alteración metabólica (Bandyopadhyay et al., 1999). No obstante, los ácidos nucleicos también son susceptibles de sufrir alteraciones por el efecto directo de los radicales libres, principalmente el ADN mitocondrial, ya que por su ubicación se encuentra expuesto a numerosos prooxidantes (Chaudiere et al., 1999). Entre los fenómenos que acontecen como consecuencia de la acción de los radicales libres sobre el ADN encontramos mutagénesis, carcinogénesis, envejecimiento y muerte celular, modificaciones oxidativas de las bases nitrogenadas, deleciones, fragmentaciones, reordenamientos cromosómicos y desmetilación de citosinas del ADN que activan genes. Además los genes supresores de tumores pueden ser modificados por cambios en una base nitrogenada crítica de la secuencia del ADN (Cadet et al., 1997; Wiseman y Halliwell, 1996).

En resumen, las alteraciones celulares surgen como consecuencia del daño que sufren las distintas biomoléculas, especialmente las presentes en las membranas celulares, alterándose así su función metabólica. Todo ello se traduce en implicaciones importantes en producción animal, ya que estas alteraciones metabólicas inciden decisivamente en parámetros importantes como la reproducción, la respuesta inmune y la salud del animal.

En el organismo vivo, resulta difícil mantener la homeostasis oxidativa. Una vez iniciada la producción de radicales libres, el proceso de oxidación se expande y amplía, ya que se trata de una reacción química autoperpetuante. En este sentido, juegan un papel crucial el sistema de defensa antioxidante, constituido por un grupo de sustancias que al estar presentes en concentraciones bajas con respecto a las biomoléculas oxidables, retrasan o previenen la oxidación de éstas así como la formación descontrolada de radicales libres (Thomas et al., 1994). El sistema de defensa antioxidante está constituido por un grupo de moléculas que pueden ser de procedencia endógena o exógena, de naturaleza hidrofílica o lipofílica y ejercer su efecto mediante procesos mediados o no por enzimas. Aunque en la bibliografía existen distintas clasificaciones, la más difundida en la literatura es la que diferencia entre antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (*Tabla II-2*). Los primeros están formados por un grupo de enzimas que catalizan la transferencia de electrones desde un sustrato hasta los radicales libres. Posteriormente los agentes reductores empleados en

esta reacción se tornan activos nuevamente gracias a la acción de distintos cofactores, siendo el más importante el NADPH proveniente de las rutas metabólicas (Chaudiere et al., 1999). Como principales antioxidantes enzimáticos encontramos las enzimas superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión transferasa y catalasa. Su localización y función se muestran en la **Tabla II-2**. Los antioxidantes no enzimáticos están constituidos por un grupo heterogéneo de moléculas. Pueden ser hidro o liposolubles y de localización intra o extracelular. Los hidrofílicos se ubican principalmente en los fluidos celulares y a este grupo pertenecen antioxidantes como el ácido ascórbico, glutatión, proteínas transportadoras de metales de transición (ferritina, transferrina, lactoferrina y ceruloplasmina) ácido úrico, ergotioneína, flavonoides y polifenoles. Los lipofílicos se localizan en las membranas celulares y juegan un papel decisivo en la interrupción de la peroxidación lipídica. Dentro de este grupo encontramos los carotenoides, la vitamina A, la coenzima Q y la vitamina E.

Tabla II-2.- Antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. (Lauridsen, 1998).

Antioxidantes	Localización	Función
Enzimáticos		
CuZn-SOD*	Eritrocitos y citoplasma	Capta radicales O_2
Mn-SOD	Mitocondria	Capta radicales O_2
Catalasa	Peroxisomas	Capta radicales O_2
GSH-Px	Citoplasma y mitocondrias	Degradación de H_2O_2 Y peróxidos
PH-GSH-PX	Membranas	Degradación de peróxidos
GTS	Membranas y citoplasma	Degradación de H_2O_2 Y peróxidos
Compuestos no enzimáticos		
Vitamina C	Citoplasma	Capta radicales OH y O_2
GSH	Citoplasma y mitocondria	Capta radicales OH y O_2
Ferritina	Citoplasma y espacio intersticial	Quelante del ión Fe^{2+}
Transferrina	Fluido extracelular	Quelante del ión Fe^{3+}
Lactoferrina	Fluido extracelular	Quelante del ión Fe^{3+}
Ceruloplasmina	Fluido extracelular	Quelante del ión Cu^{2+}
Vitamina E	Membranas celulares	Capta radicales OH, LOO
Carotenoides	Membranas celulares	Capta radicales OH, LOO, O_2

*SOD: Superóxido dismutasa; GSH-px: glutatión peroxidasa; PH-GSH-PX: fosfolípido-glutatión-peroxidasa; GTS: Glutatión-S-transferasa

II.3.- Vitamina E

La vitamina E fue descubierta por Evans y Bishop en 1922 como un factor de la dieta presente en vegetales que es necesario para la reproducción en ratas (Traber y Atkinson, 2007). Se encontró en cantidades elevadas en el germen de trigo o la harina de alfalfa. En sus experimentos, observaron que los animales presentaban algunos problemas relacionados con la función reproductiva (como reabsorciones fetales) recuperaban plenamente la funcionalidad cuando en la ración se les administraba alguno de esos alimentos vegetales.

El término vitamina E engloba una serie de compuestos antioxidantes liposolubles (Traber y Atkinson, 2007; Debier y Larondelle, 2005) presente en los tejidos del cuerpo de todas las células y es considerada como la primera línea de defensa contra la peroxidación de los lípidos. También es importante en el funcionamiento normal de las células del sistema inmune (Pekmezci, 2011). Están constituidos por cuatro isómeros, α , β , γ y δ (Traber y Atkinson, 2007), que se diferencian por el número y posición de grupos metilo unidos al anillo fenólico. La proporción de cada uno de estos isómeros es muy variable según el tipo de alimento (**Tabla II-3**). Están también formados por un anillo cromanol y una cadena isoprenoide que puede ser saturada (tocol) o insaturada (tocotrienol) (Luciano et al., 2012; Lucia, 2007; Mustacich et al., 2007; Hacquebard et al., 2008).

La vitamina E es el principal antioxidante *in vivo*, actuando de forma coordinada con toda una serie de mecanismos biológicos de protección frente a la oxidación, lo que incluye otras vitaminas (vitamina A, β -caroteno, vitamina C), toda una serie de enzimas, como la catalasa, la súper-óxido dismutasa (dependiente de Zn y Cu), la glutatión peroxidasa (dependiente del Se), etc., e incluso pequeñas cantidades de algunos antioxidantes naturales o de síntesis (López Bote, 2000; Wenk et al., 2000). La peculiaridad de la vitamina E es que se localiza principalmente en el interior de las membranas celulares y previene específicamente la oxidación de los ácidos grasos poli insaturados que constituyen los fosfolípidos (Halliwell, 1994), neutralizando así los radicales libres y dando lugar a una forma oxidada (α -tocoferil quinona).

Tabla II-3.- Contenido en Vitamina E de algunos aceites vegetales (mg/kg). (BASF, 1991)

Aceite	n	total	α -tocoferol	β -tocoferol	γ -tocoferol	δ -tocoferol	α -tocotrienol
Oliva	5	191 \pm 76*	179 \pm 73	2 \pm 2	11 \pm 3	<0.5	<0.5
Sésamo	3	528 \pm 17	10 \pm 8	<0.5	517 \pm 24	<0.5 \pm	<0.5
Girasol	8	835 \pm 199	783 \pm 191	25 \pm 10	19 \pm 16	7 \pm 7	<0.5
Soja	5	1233 \pm 42	107 \pm 11	27 \pm 9	743 \pm 63	356 \pm 31	<0.5
Cártamo	2	609 \pm 10	575 \pm 10	18 \pm 1	16 \pm 8	<0.5 \pm	<0.5
Maiz	4	1148 \pm 113	324 \pm 56	13 \pm 3	749 \pm 107	41 \pm 12	21 \pm 7

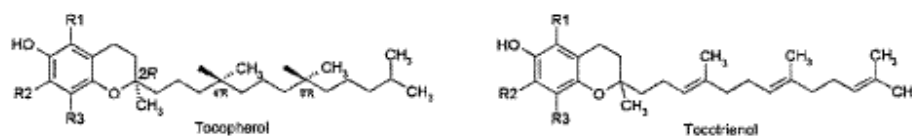
* Medias \pm SD

II.3.1.- Estructura química. Unidades

La estructura química de la vitamina E, consiste en un núcleo hidroquinona o anillo cromanol unido a una cadena isoprenoide de 12 átomos de carbono (*Ilustración II-2*). Las plantas sintetizan un total de ocho moléculas de vitamina E divididas estructuralmente en dos grandes grupos, (Debier et al., 2005) los tocoferoles y los tocotrienoles. Cada grupo esta subdividida en 4 formas o moléculas que a su vez cada una con su actividad antioxidante diferente de la otra. Las diferencias entre tocoferoles y tocotrienoles se deben a la posición y el número de los grupos metilo en el anillo cromanol. Los tocotrienoles, a diferencia de los tocoferoles, presentan dobles enlaces en las posiciones 3, 7 y 11 de la cadena isoprenoide y su actividad antioxidante es menor (Mustacich et al., 2007). También se diferencian por sus habilidades a proteger grasa y aceites de ranciedad oxidativa (Sánchez-Pérez et al., 2000).

En la posición 6 del anillo cromanol existe un grupo alcohol, que puede encontrarse esterificado a distintos grupos, dando lugar a las distintas formas éster de vitamina E. La forma éster natural más frecuente es el acetato de d- α -tocoferol cuya forma sintética es conocida como acetato de dl- α -tocoferol.

Ilustración II-2.- Estructura del tocoferol y tocotrienol. La estructura molecular de la vitamina E se caracteriza por tener un anillo cromanol sostenido por una cadena lateral alifática hidrofóbica (C16) que según que este saturada o insaturada se trata de tocoferol o tocotrienol respectivamente Hacquebard et al. (2008).



Isoforms of tocopherols and tocotrienols			
alpha-	R1=CH ₃	R2=CH ₃	R3=CH ₃
beta-	R1=CH ₃	R2=H	R3=CH ₃
gamma-	R1=H	R2=CH ₃	R3=CH ₃
delta-	R1=H	R2=H	R3=CH ₃

La diferente posición en el espacio de los grupos metilos crea las distintas formas racémicas de los tocoferoles y tocotrienoles. Si los grupos metilo se encuentran en el mismo plano, se hablan de formas R y si se sitúan en planos diferentes, se habla de formas S. El isómero natural del α -tocoferol, posee tres grupos metilos en las posiciones 2, 4 y 8 de la cadena isoprenoide, en un mismo plano, y por eso se llama también 2R, 4R, 8R o RRR α -tocoferol, o bien d- α -tocoferol. La forma sintética, es conocida como dl- α -tocoferol, y es una mezcla en la misma proporción de los isómeros R y S (Brigelius-Flohe y Traber 1999).

Ilustración II-3. Estructura química del alfa-tocoferol natural (Brigelius-Flohe y Traber 1999).

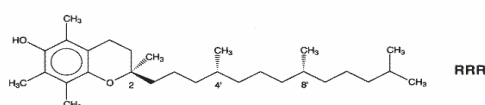
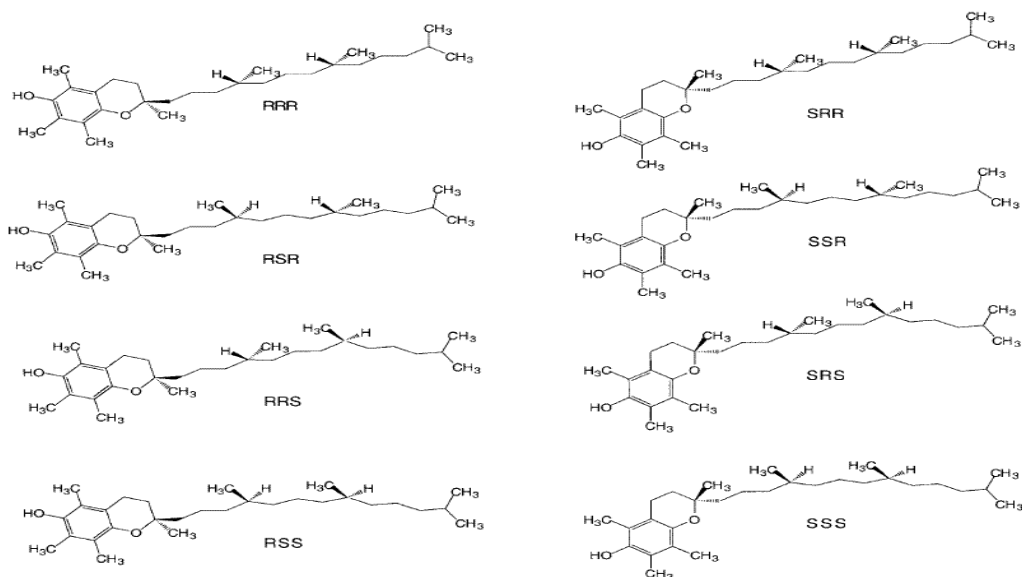


Ilustración II-4.- Estereoisómeros del alfa-tocoferol



Los compuestos de vitamina E son insolubles en agua y solubles en alcohol y otros disolventes orgánicos (éter di-etílico, acetona y cloroformo) así como en aceites vegetales (Sánchez-Pérez et al., 2000). Los aceites vegetales poli-insaturados, semillas de cereales, pescados grasos, frutos secos, huevos, hígados, productos lácteos y verdura de color verde representan las fuentes dietéticas de vitamina E. El α -tocoferol representa, la forma más común de vitamina E en los tejidos animales (Debier y Larondelle 2005).

El poder antioxidante in vivo de los tocoferoles depende de numerosos factores, como la presencia de otros tocoferoles, el substrato, temperatura, luz, solvente, tipo y concentración de prooxidantes. Todas estas variables originan ciertas discrepancias al estudiar la actividad individual de los tocoferoles. Algunos autores han señalado la existencia de sistemas preferenciales para la deposición de α -tocoferol en los animales (Behren *et al.*, 1982; Behren y Madere, 1987). La absorción de α -tocoferol de síntesis en forma de acetato de dl- α -tocoferol (forma éster) parece ser igual a la del α -tocoferol natural (Rigotti, 2007; Igbal, 2009). No obstante, se ha comprobado que al administrar cantidades elevadas de formas sintéticas en el hombre, parece existir una limitación para la hidrólisis del enlace éster

(consumos mayores a 900 mg acetato de dl- α -tocoferol por día) (Huang y Appel, 2003; Hoppe y Kraemer 2002).

En la actualidad la fuente principal de vitamina E comercializada para piensos es la mezcla de isómeros de acetato de dl- α -tocoferol acetato. La unidad internacional (UI) equivale a 1 mg de acetato de dl- α -tocoferol (*Tabla II-4*).

Tabla II-4.- Actividad biológica relativa de los diferentes isómeros de la vitamina E (Brigelius-Flohe y Traber, 1999)

Isómeros	Bioensayo de reabsorción fetal		Unión con α -TTP
	UI/mg	Actividad relativa	
RRR- α -tocoferol	1.36	0.91	---
RSR- α -tocoferol	0.85	0.57	---
RRS- α -tocoferol	1.34	0.90	---
RSS- α -tocoferol	1.09	0.73	---
SRR- α -tocoferol	0.46	0.31	0.11
SSR- α -tocoferol	0.31	0.21	---
SRS- α -tocoferol	0.55	0.37	---
SSS- α -tocoferol	1.10	0.60	---

Adaptado a partir de Bender (2003)

II.3.2.- Digestión, transporte y excreción de vitamina E

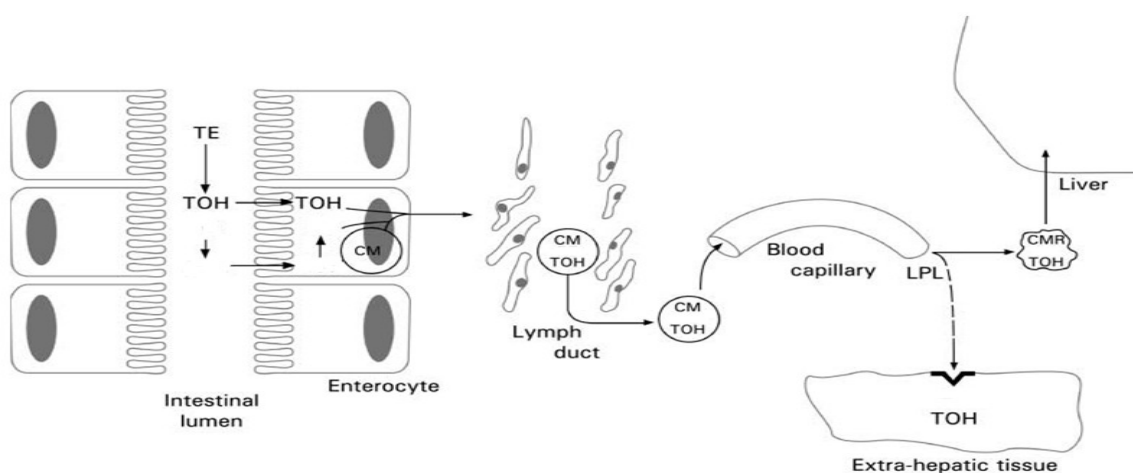
II.3.2.1.- Digestión, absorción y transporte

La vitamina E se digiere en el intestino (*Ilustración II-5*), donde los esteres de tocoferol son hidrolizados previamente (Rigotti, 2007) por acción de las esterasas (Knarreborg et al., 2004, Herrero-Barbudo et al., 2009, Lauridsen et al., 2001), momento a partir del cual es funcionalmente activa. La absorción se realiza principalmente en la zona de unión entre el tercio superior y medio del intestino delgado (Gallo-Torres, 1990). La presencia de la bilis es un pre-requisito para la emulsión y como activador de la enzima carboxil-eter hidrolasa (Lauridsen, 2007). Posteriormente la vitamina E debe incorporarse a las micelas, por lo que es esencial una correcta formación de las mismas. Por este motivo la presencia de grasa en la ración favorece la absorción de vitamina E. Las micelas, con una estructura muy pequeña, se aproximan al borde en cepillo del intestino y permiten que la vitamina E atraviese la membrana celular del intestino. En el interior del enterocito la molécula de la vitamina E es incorporada dentro de quilomicrones y vehiculada en la linfa intestinal, desde donde es transportada en lipoproteínas (Guck et al., 2000).

La eficiencia de la absorción del α -tocoferol en general es relativamente baja (Machlin, 1984) y depende de la funcionalidad del aparato digestivo (Rigotti, 2007; Boul et al., 2001), de la presencia de vitamina A, que podría disminuir su absorción o del ion férrico, que podría destruir la vitamina E. Su absorción aumenta con la incorporación de grasa en la ración, en particular los triglicéridos de cadena media (Simpson et al., 1998) ya que la presencia de ácidos grasos poli insaturados disminuye la eficiencia de absorción (Gassmann y Kubler, 1996; Simpson et al., 1998). Sin embargo, otros autores han señalado que el contenido de ácidos grasos poli-insaturados de la ración no modifica la absorción aparente de vitamina E (Tijburg et al., 1997). En estudios llevados a cabo con ratas, Gallo-Torres (1990), encontró que la absorción de α -tocoferol y/o sus ésteres ingeridos oralmente fue del 20-40% (Bender, 2003) en micelas de lípidos mezclados con otros lípidos de la dieta (Bender, 2003). La predominancia de α -tocoferol sobre otros isómeros de tocoferol en los

tejidos animales no parece ser el resultado de la alta selectividad de la absorción intestinal para los isómeros de α -tocoferol. Clement y Bourse (1997), estudiaron el transporte de alfa y gamma tocoferol en la rata, y observaron que aunque el α -tocoferol (Clement et al., 1995) parecía ser absorbido al nivel del 85 % del correspondiente al gamma-tocoferol (diferencia pequeña si se tiene en cuenta la predominancia de la forma alfa en el plasma y tejidos), la forma gamma se perdía más rápidamente que el α -tocoferol del plasma y los tejidos, lo que se explica, en parte, por la diferente actividad de estas dos formas de tocoferoles de la ración. La absorción de las formas β y γ son bajas, lo que se deduce a partir de sus bajas concentraciones en los tejidos (Lakritz et al., 1995; O'Grady et al., 1998).

Ilustración II-5.- Absorción intestinal. La forma esterificada de tocoferol (TE) es hidrolizada en el lumen intestinal y absorbido en su forma alcohol (Tocoferol TOH) por los enterocitos. El TOH no esterificado se incorpora en los quilomicrones (CM), que llegan a la circulación a través de la linfa intestinal. Los quilomicrones remanentes (CMR) se forman bajo la acción de la lipoproteína lipasa (LPL), que hidroliza los triglicéridos. Durante este proceso, parte del TOH asociado a CM es transferido a los tejidos periféricos. Sin embargo, la mayoría permanece en los quilomicrones remanentes (CMR) los cuales terminan por ser incorporados al hígado (a partir de Debier y Larondelle, 2005).



La acumulación tisular de vitamina E varía notablemente según el tejido de que se trate y parece estar relacionada con el logaritmo de la dosis administrada (Hidiroglou et al., 1997; Jensen et al., 1997) y con el tiempo de suplementación (Jensen et al., 1988; Jensen et al., 1990; Morrissey et al., 1996). Trefan et al. (2011), encontraron que el tejido con mayor

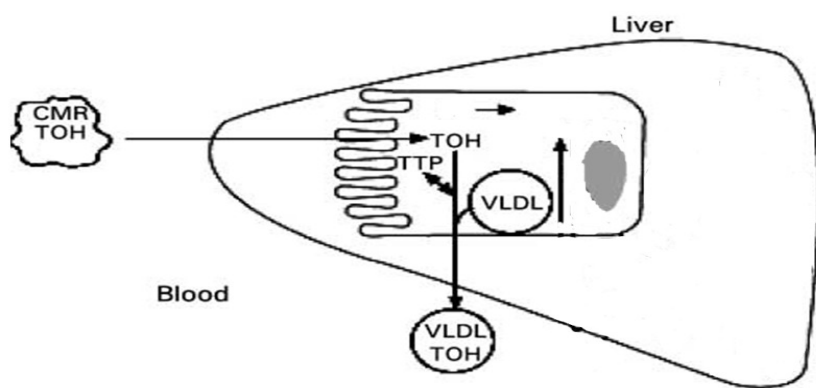
contenido en α -tocoferol en el cerdo era el hígado, seguido del corazón, pulmón, riñón y músculo. Morrissey et al. (1996) describieron una tendencia similar, con la particularidad de que estos autores analizaron además la grasa subcutánea y grasa peri-renal, presentando estos tejidos una concentración superior a los demás. Resultados comparables se han obtenido con ratas (Yamashita et al., 2002), corderos (Turner, 2002), y ganado vacuno (Nassu et al., 2011). En el caso del músculo también se ha observado que los niveles de α -tocoferol varían según la región anatómica (Luciano et al., 2011) y el tipo de músculo (Jensen et al., 1997; Turner, 2002). O'Sullivan et al. (1997) encontraron una mayor concentración de α -tocoferol en los músculos de la región torácica que en el cuarto posterior en el cerdo y Metin et al. (2010), observaron una disminución del contenido de α -tocoferol en los músculos de rata sometidas a ejercicio en relación con las que se mantuvieron en reposo. Bender (2003) evaluó la vida media de la vitamina E en diferentes tejidos así encontró que la vitamina E en los pulmones tiene una vida media de 7,6 días en el hígado 9,8 días en la piel 23,4 días en el cerebro de 29,4 días y en la médula espinal 76,3 días.

II.3.2.2.- Transporte e incorporación tisular

Empaquetado junto con los fosfolípidos, colesterol, triglicéridos y restos de las polipoproteínas en el interior de los quilomicrones, el tocoferol alcanza la torrente sanguíneo a través del sistema linfático (Rimbach et al., 2002). La lipoproteína lipasa libera el tocoferol contenido dentro, y este enseguida se dirige a los tejidos periféricos. La otra parte de los quilomicrones se dirige hacia el hígado, llegando a los hepatocitos, desde donde la vitamina E es re-excretada a la sangre. Los quilomicrones transfieren la vitamina E y esta se incorpora a las lipoproteínas VLDL con la participación de la enzima α -TTP. Una vez devuelto este complejo VLDL-TOH a la sangre, sufre un proceso de hidrólisis y la vitamina E se incorpora rápidamente en los distintos tejidos extra-hepáticos (Traber y Arai 1999; Rimbach et al., 2002; Bender, 2003; Jensen y Lauridsen 2007), localizándose la mayoría en la fracción de membrana de los diferentes tejidos (Atkinson et al., 2008; Atkinson et al., 2010). La distribución tisular se explica por la presencia de receptores

específicos en los tejidos para las lipoproteínas transportadoras (Jensen y Lauridsen 2007), por difusión pasiva desde las lipoproteínas de membrana a los tejidos o bien por la acción de la lipoproteína lipasa, que actuaría como una proteína transportadora (Traber y Arai, 1999; Tackur, 2010).

Ilustración II-6.- Almacenamiento de vitamina E. Los quilomicrones remanentes (CMR), que contienen tocoferol (TOH) son absorbidos por las células parénquimatosas del hígado. En el interior del hígado, el alfa-tocoferol es preferentemente incorporado en las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), debido a la unión selectiva a una proteína de transporte celular específica, la proteínas transportadora de alfa-tocoferol (alfa-TTP) (Debier y Larondelle, 2005; Traber et al., 2004).



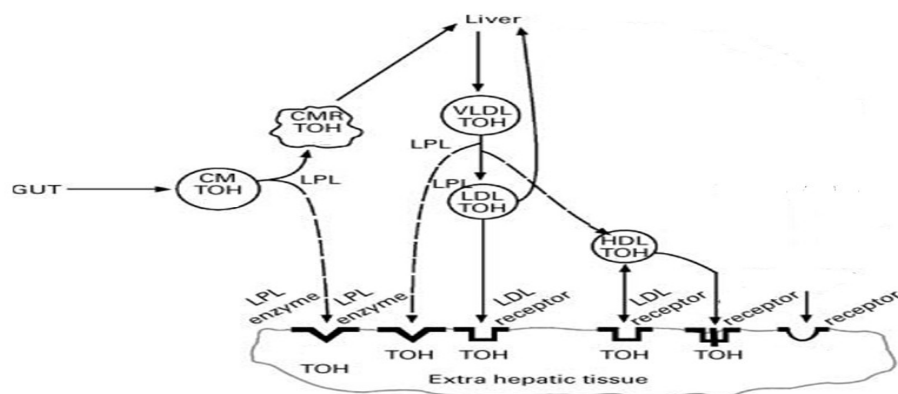
Las principales estructuras transportadoras de la vitamina E del hígado hacia las células y los tejidos son las lipoproteínas de baja (LDL) y de alta (HDL) densidad (Hacquebard et al., 2008). La proteína α -tocoferol transferasa (α -TTP), es el principal responsable de mantener las concentraciones de α -tocoferol en el plasma (Morrissey et al., 1996; Traber et al., 2004) facilitando la secreción del hígado hacia el plasma mediante un mecanismo que aún no está plenamente descrito (Traber, 2007). Algunos estudios han demostrado que al bloquear el gen α -TTP se observa una deficiencia de vitamina E. La afinidad de la α -TTP es mayor cuando el anillo cromanol se encuentra totalmente metilado y cuando el radical metilo localizado en la posición 2 de la cadena lateral se encuentra en una forma determinada (forma R). Este último requisito hace que la proteína transportadora α -TTP transporte con mayor afinidad los isómeros 2R de α -tocoferol. La unión preferencial de la proteína α -TTP,

hace que la vida media de la forma RRR- α -tocoferol sea tres veces superior (57 ± 19 horas) a la vida media de de la forma SRR- α -tocoferol o γ -tocoferol (Traber, 2007; Traber y Atkinson, 2007).

Por esta razón que el α -tocoferol es la forma de vitamina E que más actividad biológica tiene al ser la forma RRR- α -tocoferol, preferentemente incorporado a la lipoproteína. Este mecanismo hepático para la secreción preferencial del isómero RRR comparado con otra forma de vitamina E en la dieta, o la forma sintética, es también el resultado de una función del α -TTP hepática (Traber et al., 2004).

Estudios en humanos han revelado que las personas con anomalía (Brigelius-Flohé y Traber, 1999) en el gen para α -TTP desarrollan un trastorno llamado “ataxia” (Bender, 2003; Traber, 2007) con deficiencia de vitamina E (AVED). Estos pacientes no tienen capacidad para diferenciar entre las formas RRR y SRR- α -tocoferol, dos formas de α -tocoferol que solo se diferencian en quiralidad en la posición C2 de α -tocoferol donde el anillo cromanol se une con la cadena lateral (Traber, 2007; Traber et al., 2004).

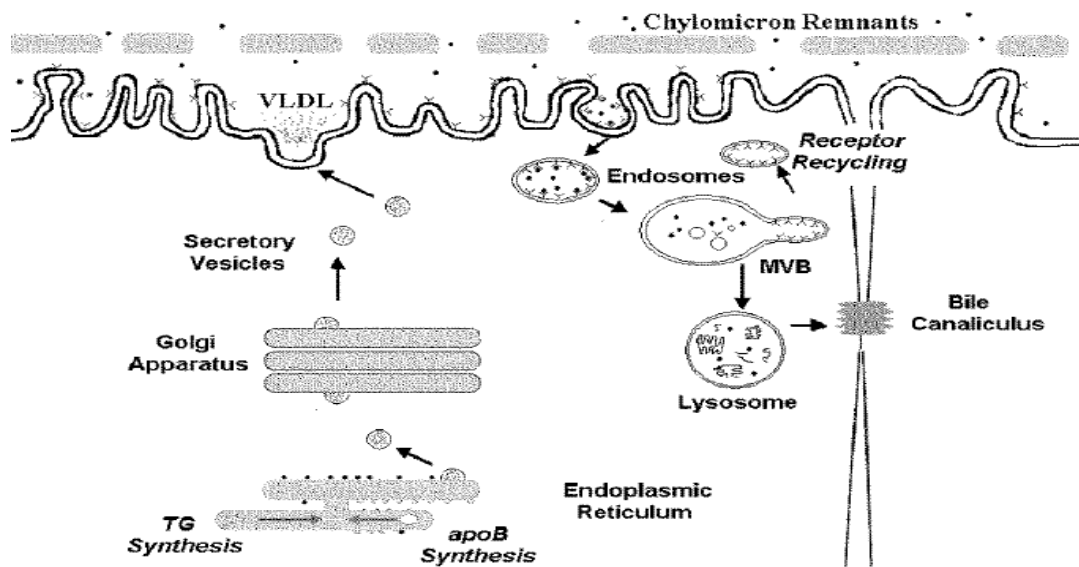
Ilustración II-7.- Transporte e incorporación tisular. El tocoferol (TOH) circula asociado a los quilomicrones (CM). Una pequeña parte se incorpora en los tejidos extra-hepáticos siguiendo la acción de la lipoproteína lipasa (LPL), mientras que el hígado absorbe el resto de los remanentes de quilomicrones (CMR). El alfa-tocoferol del hígado es secretado a la circulación asociándose con VLDL. Durante este proceso de lipólisis, parte de los TOH se transfiere a los tejidos periféricos o a la HDL. El resto del TOH termina en la lipoproteína LDL, y también se transfiere a los tejidos periféricos así como a las células parenquimatosas del hígado a través de la vía del receptor de LDL (Debier y Larondelle, 2005; Traber et al., 2004).



II.3.2.3.-Excreción de la vitamina E

El hígado no acumula cantidades tóxicas de vitamina E aunque la ingestión sea muy elevada. Existe un consenso generalizado que indica que la vitamina E de la dieta entra en los hepatocitos en quilomicrones remanentes a través de un proceso receptor-mediador que finalmente sigue por defecto la ruta endosoma/lisosomal y se excreta de los lisosomas a la bilis (Traber et al., 2004) (*Ilustración II-8*).

Ilustración II-8.- Excreción biliar de la vitamina E. Esquema de captación de quilomicrones remanentes, la hidrólisis y la síntesis de VLDL (Traber et al., 2004).

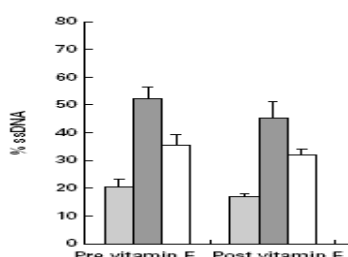


II.3.3.- Funciones de la vitamina E.

La vitamina E es un antioxidante lipídico que permite eliminar los radicales libres en la membranas celulares y órgano-subcelulares, por lo que protege los ácidos grasos poli-insaturados de dicha membrana (Guo et al., 2010; Guo et al., 2001; Hidiroglou et al., 2003; López-Bote et al., 2003). Por otra parte, juega un papel en la protección de algunas moléculas como el DNA (Bremann et al., 2000) contra la oxidación lo cual previene el cáncer, el envejecimiento, muerte celular y las enfermedades coronarias entre otras.

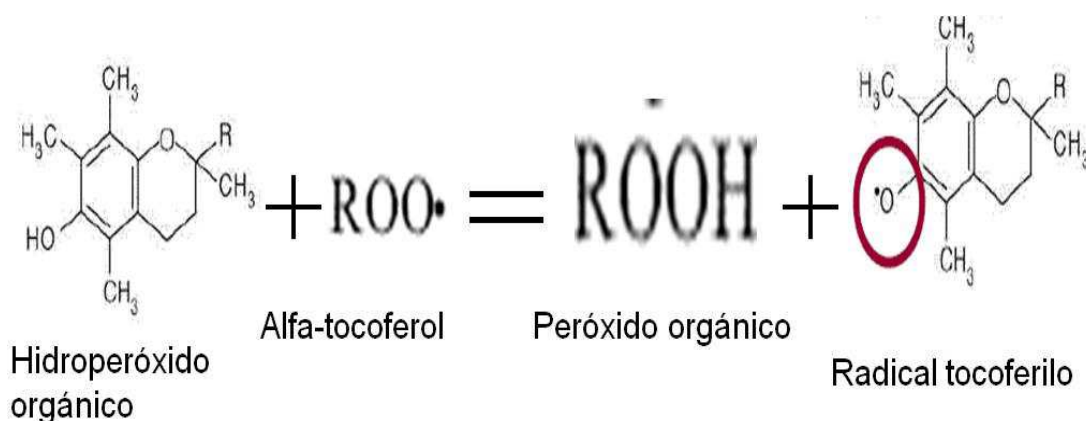
A parte de estas funciones biológicas, la vitamina E mejora la estabilidad oxidativa post-mortem incrementando así la calidad de la carne (López Bote et al., 2000). El mecanismo para ejercer esas funciones se pueden ver en la (*Ilustración II-10*). El grupo hidroxifenólico de la vitamina E reacciona con el peróxido orgánico cediéndole un electrón para transformarse en los correspondientes productos: un radical hidroperóxido orgánico y el radical tocoferilo (Mustacich et al 2007). La acción antioxidante de la vitamina E como limpiador de radicales peróxido que termina la reacción en cadena y protectora de la membrana celular contra la oxidación de los ácidos grasos poli-insaturados es un fenómeno bien conocido (López-Bote et al., 2003).

Ilustración II-9.- Cuantificación del nivel daños del DNA en sujetos suplementados con vitamina E



Fuente: Bremann et al. (2000). Esta figura ilustra niveles daños endógenos del DNA inducidos con H₂O₂ de los linfocitos periférico de la sangre de sujetos (n=7) suplementados con vitamina E con una dosis (2 x 400 mg/d) ■ Control linfocitos no tratados ■ linfocitos tratados con 200 μM H₂O₂ □ linfocitos tratados con 10 μM H₂O₂. Los valores de daños del DNA son expresados en porciento (ANOVA) p<0,05.

Ilustración II-10.- Esquema de reacción de la vitamina E con un radical libre (Mustacich et al 2007).

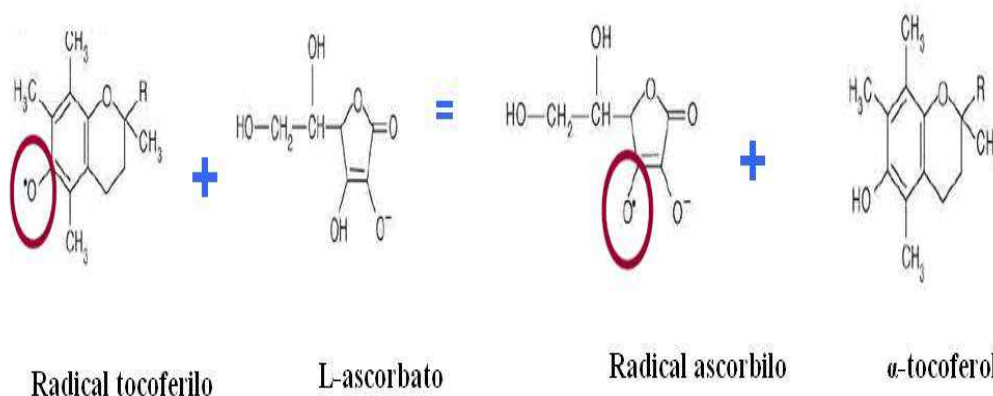


Por lo general, la vitamina E es incapaz de actuar sola o de forma aislada por lo tanto necesita un proceso de reciclaje en el que participan otros antioxidantes hidrosolubles como la vitamina C (Pinelli-Saavedra et al., 2008) o cualquier otro reductor como la glutatión que sirve para donar un electrón de H reaccionando con el radical tocoferoxilo formado. Como se puede observar en el siguiente esquema, el proceso tiene como consecuencia la regeneración de la molécula de vitamina E (Mustacich et al 2007), que luego entraría en el mismo proceso oxido-reductor. Bender (2003) enumeró cuatro vías en las que el radical toferoxilo formado por la reacción de α -tocoferol con un peróxido de lipido puede ser reducido y volver a pasar a tocoferol:

1. Por la reacción del tocoferoxilo con el ascorbato para dar lugar al radical monodihydro-ascorbato o ascorbilo (*Ilustración II-11*) que a su vez puede ser reducido a ascorbato o puede someterse a dismutación para producir deshidro-ascorbato y ascorbato.
2. Mediante la reacción con glutatión, catalizada por una membrana iso-enzima específica de glutatión peroxidasa, que es un seleno-enzima. Así, además de su papel en la eliminación de los productos de la peroxidación lipídica, el selenio tiene un papel directo en el reciclaje de tocoferol.

3. Por la reacción con otros antioxidantes hidrosolubles en lípidos en la membrana o lipoproteínas, incluyendo ubiquinona, que está presente en grandes cantidades en todas las membranas como parte de una cadena de transporte de electrones en la membrana mitocondrial interna.
4. Por último en la mitocondria por la reacción con la cadena de transporte de electrones ligados a la oxidación del NADH, succinato, o citocromo c reducido.

Ilustración II-11.- Esquema de regeneración de la vitamina E con participación de la vitamina C (Mustacich et al 2007).



II.3.3.1.- Efecto sobre la membrana celular

Las membranas celulares son muy susceptibles a la oxidación lipídica (Hacquebard et al., 2008) pues contienen una alta cantidad de fosfolípidos insaturados que se encuentran en contacto con el contenido celular en el que se encuentran distintos catabolitos de la oxidación lipídica y oxígeno (Decker y Hultin, 1992; Kanner et al., 1987; Rimbach et al., 2002). El α -tocoferol es el isómero de la vitamina E mas bioactivo y se considera como el más potente anti-oxidante de lípidos solubles, que son los responsables de la protección de los ácidos grasos poli-insaturados (López-Bote et al., 2003) de la membrana celular (Alpsoy y Yalvac, 2011). La vitamina E existe en la membrana celular a una concentración de una molécula de vitamina por 2000-3000 fosfolípidos. Por lo tanto, se agotan de forma

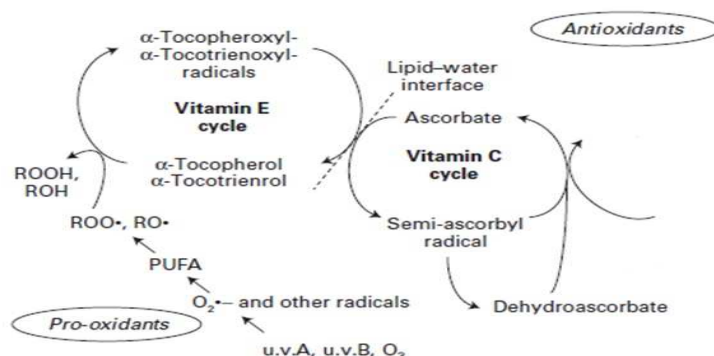
muy rápida, a menos de que se regenere en su forma activa (Rimbach et al., 2002). Un indicativo de la intensidad de la peroxidación de los lípidos a nivel de la membrana es la concentración de malondialdehído (MDA) que es uno de los residuos finales de la destrucción de los lípidos (Lauridsen, 2010). Los ácidos grasos poli-insaturados esenciales que constituyen las membranas celulares juegan un papel importante en la generación de compuestos metabólicamente muy activos. Por lo tanto al proteger frente a la oxidación los ácidos grasos poli-insaturados (PUFAs) de los fosfolípidos y las lipoproteínas de las membranas celulares (Debier et al., 2005), la vitamina E ejerce dos funciones claramente establecidas. Por un lado permite mantener la integridad estructural de las membranas, incluso en presencia de radicales libres (Diplock, 1983). La vitamina E como anti-oxidante actúa defendiendo las membranas celulares como eliminadores de radicales libres manteniendo así la integridad de los órganos y sistemas. Buena parte de la resistencia a la infección por acción de la vitamina E se debe al mantenimiento en óptimas condiciones de las membranas mucosas y al normal funcionamiento de las glándulas adrenales para la formación de cortico-esteroides, necesarios para combatir las enfermedades (Guo et al., 2010; Guo et al., 2001).

Por otra parte, los ácidos grasos poli-insaturados de la membrana biológica son particularmente sensibles a los ataques de los radicales libres. El papel que desarrolla la vitamina E para proteger la membrana puede explicarse en la (*Ilustración II-12*). Siendo compuestos electrofílicos, los radicales libres atacan los ácidos grasos poli-insaturados extrayéndoles un electrón de hidrogeno y convirtiéndolos en un radical PUFA[•]. El compuesto formado reacciona con el oxígeno para formar un radical peróxido PUFAOO[•] que está capacitado para extraer un electrón de los ácidos adyacente, propagando así reacciones encadenadas de un modo progresivo y exponencial, en un proceso descontrolado que se generaliza en poco tiempo. El proceso auto-oxidación en poco tiempo afecta severamente al funcionamiento celular. Frente a esta situación, la vitamina E dona el electrón de H de su grupo hidroxifenólico formando así un compuesto lipídico mas estable (radical α -tocoferilo). La vitamina E, al donar su electrón se transforma a su vez en un radical libre inactivo. La vitamina C que actúa junto con la vitamina E dona un electrón a

radical α -tocoferilo el cual se recupera su estado anterior con nueva capacidad antioxidante (Rimbach et al., 2002).

Frente a una deficiencia en vitamina E, se observa una acumulación de lisofosfatidilcolina en la membranas, las cuales tienen un efecto citolítico. Esta acumulación de lisofosfatidilcolina resulta de una actividad de la fosfolipasa A. El tocoferol interviene en la organización y la fluidez de la membrana para prevenir esta acción citolítica de la lisofosfatidilcolina (Bender, 2003).

Ilustración II-12.- Esquema de interacción de la vitamina E (Rimbach et al., 2002)



Este sistema mévalo-enzimático que sirve para prevenir la formación de radicales libres, intervienen ciertos antioxidantes como cuyo papel es convertir los O₂ a H₂O₂ mientras que la glutatión peroxidasa y la catalasa reduce aun más los H₂O₂ previniendo así la formación de OH altamente reactivo. Por otra parte los antioxidantes solubles en agua pueden actuar como antioxidantes independiente o pueden actuar como co-factor de las enzimas antioxidantes para el reciclaje de la vitamina E (Rimbach et al., 2002).

II.3.3.2.- Efecto sobre el metabolismo lipídico.

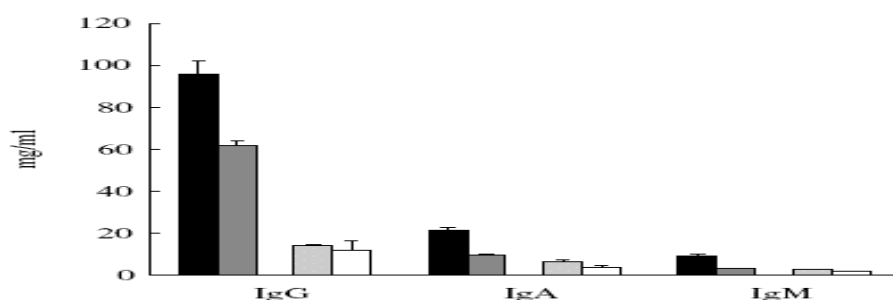
Los niveles de vitamina E existentes en los tejidos, están relacionados positivamente con la cantidad incluida en la ración y la duración del periodo de administración. La estrategia a seguir para la utilización de vitamina E en los animales productores de carne consiste en

lograr una cantidad de α -tocoferol en los tejidos suficiente para conseguir la máxima protección de los mismos contra la oxidación lipídica (Daza, et al. 2003; López-Bote et al., 2003) y por tanto evitar su deterioro (Lauridsen *et al.*, 1999). La deficiencia en vitamina E conlleva a un aumento de la peroxidación lipídica (Benber, 2003).

II.3.3.3.- Otros efectos biológicos

La utilización de vitamina E en alimentación porcina tiene como finalidad no sólo el prevenir signos de deficiencia. Diversos trabajos indican que la suplementación por encima de los niveles mínimos recomendados mejora la respuesta inmune humoral y celular (Meydani y Beharka, 1998; Pekmezci, 2011). La vitamina E realiza una importante función en el mantenimiento de la fisiología celular, siendo necesaria para multitud de funciones, algunas de las cuales son difíciles de establecer con precisión. Además, se ha relacionado directamente la concentración de vitamina E con el funcionamiento de los sistemas reproductor, muscular, circulatorio, nervioso (Wuryastuti et al., 1993) y la resistencia a distintos procesos patológicos (Pekmezci, 2011). Por otra parte, la vitamina E es extremadamente importante en los recién nacidos ya que son más propensos a sufrir daños oxidativos que los adultos. Además, las dietas suplementadas con vitamina E estimulan generalmente la producción de anticuerpos (Muir et al., 2002; Lauridsen y Jensen, 2005), y se consideran de importancia para el desarrollo del sistema inmune de los animales jóvenes (Debier et al., 2005; Debier y Larondelle, 2005). Una deficiencia en vitamina E empeora la respuesta del sistema inmunológico mientras que la suplementación mejora la inmunidad en ciertos casos (Debier y Larondelle, 2005) y produce una respuesta más rápida al inocularse *E. coli* (Lauridsen et al. 2011).

Ilustración II-13.- Concentración de inmunoglobulinas en calostro (antes de la succión) y leche (24 horas después del nacimiento) (a partir de Le Dividich et al., 2005).



Concentración de inmunoglobulina en calostro (antes de la succión) en leche (24 horas después del nacimiento) Calostro ■ Leche ■

I.3.3.4.- Efecto sobre la calidad de la carne

Las dietas suplementadas con vitamina E representan una opción viable para extender la vida útil de la carne debido a las propiedades antioxidantes de la vitamina E que le permite evitar daños oxidativos post-mortem (Lauridsen, 2010; Lokman y Mehmet, 2011, López-Bote, 2002; Archille-Contreras y Purslow, 2010; Sales y Koukolova, 2011).

En este sentido, existe un gran número de estudios realizados en el ganado porcino en los que se ha demostrado la existencia de una relación positiva entre la administración de cantidades elevadas de vitamina E y algunos atributos de calidad de la carne (Morrissey et al., 1996). Entre estos atributos cabe destacar que la vitamina E mejora la estabilidad oxidativa de la carne de cerdo (Rey et al., 1997; Daza et al., 2005; Rey et al., 2006), la estabilidad del color (Monahan et al., 1994) y reduce las pérdidas de exudado (Archille-Contreras, 2011; Monahan et al., 1994). Favorece además el desarrollo del aroma de la misma y la calidad sensorial (Díaz, 2009), y disminuye la susceptibilidad a que se desarrollen procesos oxidativos (Trefan et al., 2011).

II.3.4.- Estatus de vitamina E en el lechón recién nacido

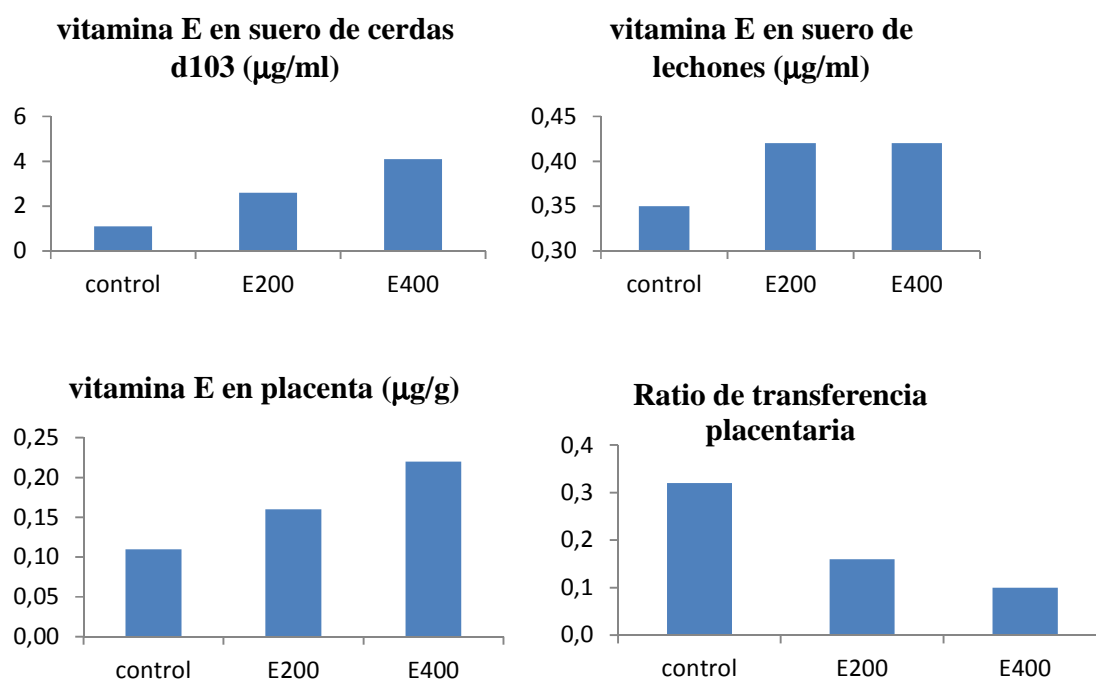
La vitamina E es un nutriente esencial para garantizar el crecimiento y el buen estado de salud de los lechones que nacen con unas reservas muy bajas de grasa y una baja concentración de vitamina E en los tejidos (Lauridsen et al., 2002). Existen dos momentos críticos en la vida de los lechones en los que los niveles de vitamina E juegan un papel transcendental: inmediatamente después del nacimiento y después del destete (Lauridsen y Jensen, 2005). Es por ello, que la transmisión de vitamina E de la madre al feto por vía trans-placentaria y mediante el calostro y la leche juega un papel fundamental y son objeto de investigación.

II.3.4.1.- Transmisión de Vitamina E vía placentaria

En relación a la vía transplacentaria de vitamina E, la información en las distintas especies animales es escasa y existe cierta controversia. Por un lado Malm et al. (1976) observaron que la concentración sérica de α -tocoferol en lechones recién nacidos, que no habían iniciado el amamantamiento era superior a la de sus madres, sugiriendo por tanto una transferencia eficiente de vitamina E a través de la placenta, incluso cuando los piensos de las madres no habían sido suplementados. En contraposición, numerosas investigaciones más recientes han sugerido que, con anterioridad a la lactancia, la concentración de α -tocoferol en el suero y los tejidos de los lechones recién nacidos es baja aunque la madre reciba unos niveles adecuados en la ración (44-50 mg de vitamina E / kg de pienso, NRC, 1998) o incluso niveles elevados de vitamina E durante la gestación (Babinszky et al., 1991; Farnworth et al., 1995; Hidioglou et al, 1995). A la vista de los resultados de estas investigaciones cabe pensar que la tasa de transferencia de la vitamina E a través de la placenta en cerdos es baja. Investigaciones realizadas en otras especies, como corderos y terneros arrojan resultados similares (Njeru et al., 1994). No obstante, resulta interesante conocer si esta baja tasa de transferencia es proporcional al nivel de suplementación del pienso de la cerda gestante. Así, Mahan (1991) observó que la concentración de α -tocoferol en el suero de los neonatos se incrementaba cuanto mayor era el nivel de inclusión de vitamina E en el pienso de la cerda. Por otro lado, Pinelli-Saavedra y Scaife (2005) realizaron un experimento con cerdas gestantes a las que suministraron tres tipos de pienso con distintos niveles de vitamina E (grupo control: 36mg/kg; grupo suplementado E200: 200 mg/kg y grupo suplementado E400: 400mg/kg) donde observaron que existían diferencias en los niveles de vitamina E en placenta y sangre de los lechones recién nacidos entre el grupo control y los grupos suplementados; sin embargo entre los dos grupos que habían recibido distintos niveles de suplementación no se observaron diferencias significativas al respecto (*Ilustración II-14*). Para profundizar en este hallazgo, se utilizó el ratio de transferencia placentaria (RTP), que se calcula dividiendo la concentración de vitamina E en el suero de los lechones entre la concentración en el suero de las madres en el día 103 de gestación. Este valor disminuyó linealmente respecto al nivel de vitamina E

ingerido por las cerdas en la ración (*Ilustración II-14*). De estos datos se desprende claramente que la transferencia de la vitamina E a través de la placenta es menos eficiente cuanto mayor es su concentración en el suero de la cerda. En la misma línea, Malm et al. (1976) observaron que la transferencia de la vitamina E a través de la placenta fue más eficiente cuando los piensos de las cerdas no se suplementaron. A partir de lo expuesto anteriormente y de experimentos realizados por otros autores (Hidiroglou et al., 1993; Mahan y Vallet 1997; Lauridsen et al., 2002) puede afirmarse que la placenta actúa como barrera en la transferencia de la vitamina E. El mecanismo por el cual la vitamina E se transfiere a través de la placenta aún no está claro. La identificación de la proteína de unión al tocoferol (tocopherol binding protein) en la placenta de humanos y ratones (Gordon et al., 1996; Yokota et al., 2001) y los hallazgos que demuestran que la vitamina E atraviesa la placenta unida a esta proteína en humanos (Acuff et al., 1998) ha provocado que se especule sobre un proceso similar en los cerdos. Si esto fuera cierto, se ha demostrado que estas proteínas pueden llegar a saturarse si se exponen a altas concentraciones de α -tocoferol en el lado materno de la placenta. Ésto permitiría explicar la disminución de la eficiencia de la transferencia trans-placentaria de α -tocoferol en cerdas que han sido suplementadas con un elevado nivel de vitamina E en el pienso. Se requieren trabajos adicionales para esclarecer el mecanismo por el cual se transfiere la vitamina E a través de la placenta, aunque parece evidente que esta vía de transferencia es ineficiente.

Ilustración II-14.- Concentración de vitamina E en suero de cerdas en el día 103 de gestación, en lechones, en placenta y ratio de transferencia placentaria en función del nivel de inclusión de vitamina E en el pienso (control: 36mg/kg de pienso; E200: 200mg/kg de pienso y E400: 400mg/kg de pienso) (Pinelli-Saavedra y Scaife, 2005)

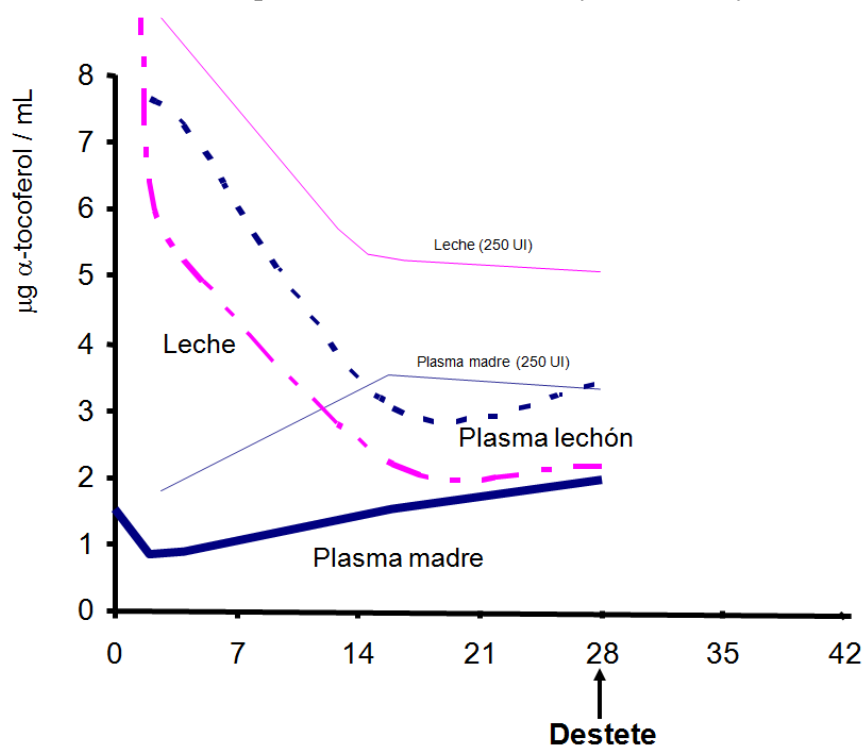


II.3.4.2.-Transferencia de vitamina E a través de la leche y el calostro

Puesto que el lechón nace con un nivel muy bajo de vitamina E, es importante que las necesidades de esta vitamina sean cubiertas mediante el consumo de calostro y leche materna. *El límite para evitar una situación de deficiencia en la concentración de α -tocoferol se considera que es 0.4-1.0 mg / l en plasma (Van Vleet, 1980).* Sin embargo, para conseguir una respuesta inmune óptima que garantice un adecuado crecimiento y estado de salud, Jensen et al. (1988) propusieron que es necesario una concentración de 3 mg / l de tocoferol en sangre. No obstante, otros autores han establecido que puede considerarse un estatus de vitamina E satisfactorio con una concentración en plasma o suero de 1,5-2,0 mg / l (Willburn et al., 2008). Para conseguir estas cifras en los lechones, numerosas investigaciones han demostrado que los niveles de enriquecimiento con vitamina E en el pienso de las cerdas al final de la gestación y durante la lactación se

relacionan claramente con los niveles de dicha vitamina en la leche, el calostro y como consecuencia en el suero y tejidos de los lechones. Así, Lauridsen y Jensen (2005) observaron el efecto positivo del enriquecimiento del pienso de las madres con 250 UI / kg de acetato de α -tocoferol desde una semana antes del parto y durante la lactación sobre el contenido de α -tocoferol en los lechones en plasma y tejidos en comparación con la progenie de otros grupos de hembras que habían recibido un nivel de suplementación inferior. Se ha observado que durante la última semana de gestación y los primeros días postparto la concentración de vitamina E disminuye en el plasma de las madres como consecuencia de la concentración de dicha vitamina en la glándula mamaria para enriquecer el calostro (Lauridsen et al., 2002), donde la concentración es varias veces superior a la de la leche (Csapo et al., 1996). Coincidiendo con esta dinámica, en el lechón los niveles de α -tocoferol en el plasma son mayores los primeros días de la lactación en relación con el consumo del calostro (*Ilustración II-15*). Posteriormente estos niveles comienzan a disminuir a lo largo de toda la lactancia hasta que se produce el destete, momento en el cual el nivel de tocoferol en el plasma del lechón debe situarse en torno a los 3 mg / l para evitar futuros problemas en el destete (*Ilustración II-15*). Por tanto, dada la capacidad de la cerda para enriquecer la leche con vitamina E a partir de su alimentación, resulta obligatorio plantearse las recomendaciones de los piensos de las madres teniendo en cuenta las necesidades de las crías para conseguir un óptimo estatus oxidativo del lechón durante toda la fase de lactancia y que tras el destete no surjan problemas de deficiencia.

Ilustración II-15.- Evolución de la concentración de vitamina E en leche, plasma de la madre y de su progenie a lo largo de la lactación, en función del nivel de enriquecimiento con vitamina E del pienso de las cerdas (a partir de Lauridsen, 2002 y Lauridsen y Jensen, 2005)



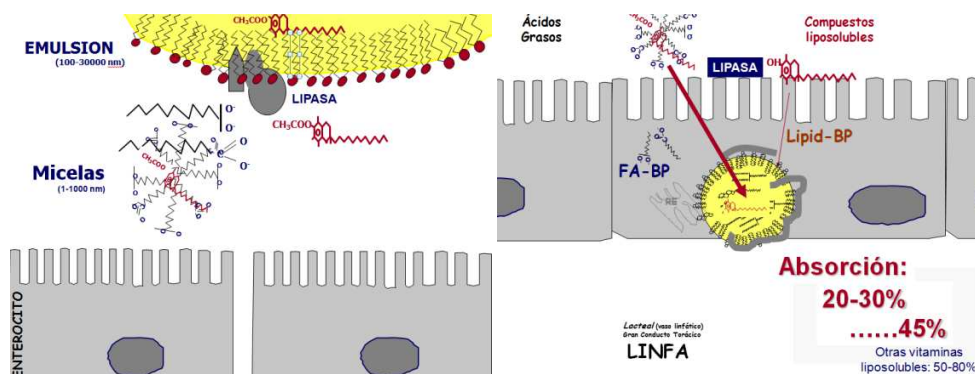
II.3.4.3.- Vitamina E en el lechón destetado

Como ya hemos indicado, el destete es uno de los momentos en la vida del cerdo donde se produce una situación especialmente delicada en lo referente a mantener el estatus oxidativo, máxime con la instauración generalizada de prácticas de destete precoz en la producción porcina, por motivos fundamentalmente económicos. Es en este momento donde confluye una serie de factores estresantes (separación de la madre, transición al alimento sólido, patologías digestivas, etc.) que provocan un marcado estrés oxidativo y como consecuencia un descenso considerable en las concentraciones de α -tocoferol en plasma y tejidos, pudiendo desembocar incluso en una situación de deficiencia (Mahan et al., 1973). Además existen una serie de factores que complican que el lechón mediante la ingesta de alimento pueda recuperar los niveles óptimos de esta vitamina. Por un lado, durante el periodo inmediatamente posterior al destete, el lechón presenta una capacidad de

ingestión limitada y una reserva de grasa corporal baja que puede perderse metabólicamente durante esta etapa provocando en el animal problemas de termorregulación y como consecuencia estrés ambiental. Por otro lado, es importante tener en cuenta los problemas en la digestión de la vitamina E en los lechones. Dicha digestión tiene lugar en el intestino, donde los ésteres de tocoferol son hidrolizados previamente por acción de las esterasas, momento a partir del cual es funcionalmente activa. La absorción se realiza principalmente en la zona de unión entre el tercio superior y medio del intestino delgado. La presencia de la bilis es un pre-requisito para la emulsión y actúa como activador de la enzima carboxil-ester hidrolasa (Lauridsen et al. 2007). Posteriormente la vitamina E debe incorporarse a las micelas, siendo la presencia de grasas fundamental para una correcta formación de las mismas. Posteriormente, las micelas se aproximan al borde en cepillo del intestino atravesando la membrana celular del intestino. En el interior del enterocito la molécula de la vitamina E es incorporada dentro de los quilomicrones y vehiculada en la linfa intestinal, desde donde es transportada en lipoproteínas (**Ilustración II-16**). En conjunto, se estima que del total de la vitamina E consumida por el animal únicamente llega al plasma un 20-30%, como máximo un 50%. Concretamente en los lechones, se ha observado en las primeras semanas post-destete una síntesis limitada de la enzima carboxil-ester hidrolasa, indispensable para la hidrólisis del acetato de α - tocoferol presente en el pienso de los lechones, hecho necesario para que pueda producirse su absorción. Además, es importante tener en consideración que las vellosidades intestinales de los lechones sufren un importante acortamiento inmediatamente después del destete, produciéndose una pérdida del borde en cepillo de las mismas. Es en esta localización donde se liberan numerosas enzimas digestivas y se produce la absorción de nutrientes, entre ellos la vitamina E. Todos estos factores condicionan que durante los 7 primeros días tras el destete se produzca un descenso brusco en las concentraciones plasmáticas y tisulares de α - tocoferol (Moreira y Mahan, 2002). Esta primera semana post-destete se considera un momento crítico donde el estatus oxidativo puede verse seriamente comprometido, observándose como consecuencia durante este periodo un incremento de la mortalidad de los lechones y una incidencia más elevada de enfermedades deficitarias como

diarreas, enfermedad del corazón en mora, edema intestinal e incluso muerte súbita (Mahan et al., 1973).

Ilustración II-16.- Esquema del proceso digestión y absorción de la vitamina E.



Para intentar paliar la deficiencia en vitamina E de los lechones destetados se han probado distintas estrategias nutricionales. Entre ellas cabe destacar el incremento de acetato de α -tocoferol en el pienso de iniciación, el uso de aditivos y materias primas que favorezcan la digestión y absorción de la vitamina, y el enriquecimiento del pienso de las madres para favorecer la transferencia a los lechones.

Las recomendaciones de vitamina E establecidas por el NRC (1998) para el pienso de lechones son de 16 UI/kg pienso entre 5 y 10 kg de peso vivo y de 11UI/kg para cerdos de más de 10 kg. En la práctica, estos piensos frecuentemente incluyen niveles muy superiores a los recomendados por el NRC para evitar patologías asociadas a deficiencia. Numerosas investigaciones se han centrado en estudiar si es posible frenar la caída de α -tocoferol en los lechones después del destete mediante el enriquecimiento del pienso con niveles elevados de esta vitamina. Moreira y Mahan (2002) desarrollaron un experimento con 8 grupos de lechones que recibieron 8 raciones distintas que diferían en el nivel de vitamina E incluido en el pienso (0, 20, 40, 60, 80, 100, 150 o 200 UI/kg de pienso). Durante la primera semana tras el destete, todos los grupos experimentales sufrieron un descenso brusco en la concentración de α -tocoferol en suero, aunque los valores se ajustaron a una

función cuadrática en función del nivel de suplementación del pienso (*Ilustración II-17*). No obstante, en todos los grupos la concentración de α - tocoferol en suero durante este periodo fue baja, situándose entre 1 y 2 mg/l (*Ilustración II-17*). En aquellos animales que no recibieron suplementación (0) se observó un descenso lineal del α - tocoferol en suero desde el día 7 hasta el 42 post-destete (*Ilustración II-17*). Durante este mismo periodo, los cerdos que recibieron de 20 a 80 UI/kg de pienso mostraron concentraciones séricas de α - tocoferol menores que los que recibieron de 100 a 200 UI/kg. De hecho, los niveles durante este tiempo se incrementaron linealmente en función de la concentración de vitamina E incluida en el pienso. Por otro lado, Lauridsen (2010) realizó un experimento en el que suministró a tres grupos de lechones, tres niveles diferentes de vitamina E en el alimento (85, 150 y 300 UI/kg de pienso). Nuevamente se observó una caída pronunciada de la concentración de α - tocoferol durante la primera semana post-destete, desde unos niveles de 4,5 mg / l hasta 1,5 mg / l de media, independientemente del nivel de inclusión de vitamina E en el pienso (*Ilustración II-18*). De hecho, no se observaron diferencias entre los distintos grupos en los niveles séricos de α - tocoferol hasta la 3ª semana post-destete (*Ilustración II-18*). No obstante, es importante remarcar que en ningún momento ninguno de los grupos experimentales llegó a presentar niveles séricos indicativos de deficiencia (por debajo de 1 mg / l). A la vista de los resultados obtenidos en los distintos experimentos, puede afirmarse que el enriquecimiento del pienso de iniciación con vitamina E muy por encima de los niveles recomendados por el NRC (1998) puede mejorar los niveles de α - tocoferol en los lechones, pero no es suficiente para paliar la caída tan brusca que se produce durante la primera semana post-destete.

Ilustración II-17.- Concentración de α -tocoferol en el suero sanguíneo de lechones destetados según la concentración de vitamina E en el pienso (entre 0 y 200 UI/kg) (Moreira y Mahan, 2002)

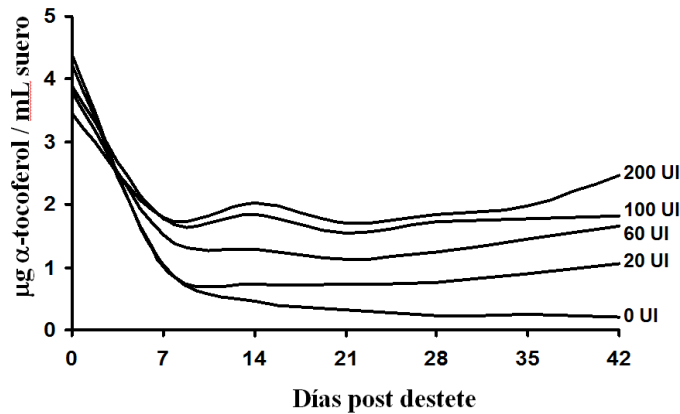
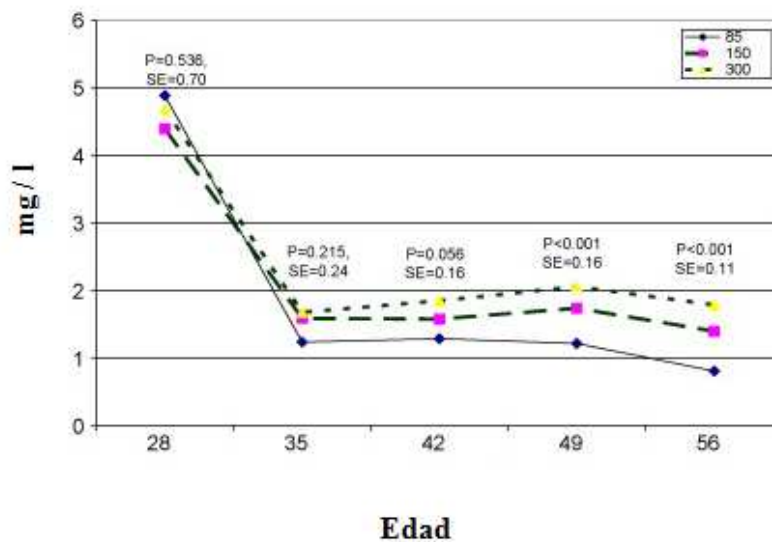


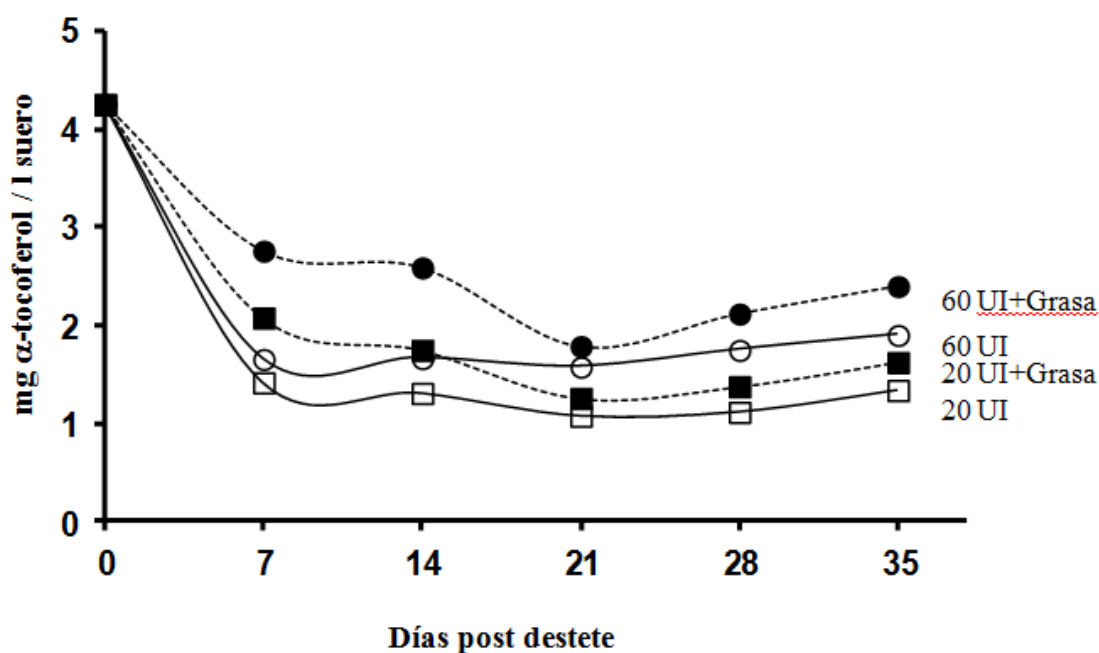
Ilustración II-18.- Concentración de α -tocoferol en el suero sanguíneo de lechones destetados según la concentración de vitamina E en el pienso (85, 150 y 300 UI/kg) desde el destete (d28) hasta el día 56 de edad (a partir de Lauridsen, 2010)



Otra de las estrategias nutricionales utilizadas para incrementar la concentración de α -tocoferol en suero y tejido de los lechones se centra en el uso de aditivos y materias primas que favorezcan la digestión y absorción de dicha vitamina. La vitamina E se encuentra esterificada en el pienso para proveerla de mayor estabilidad. Como hemos indicado

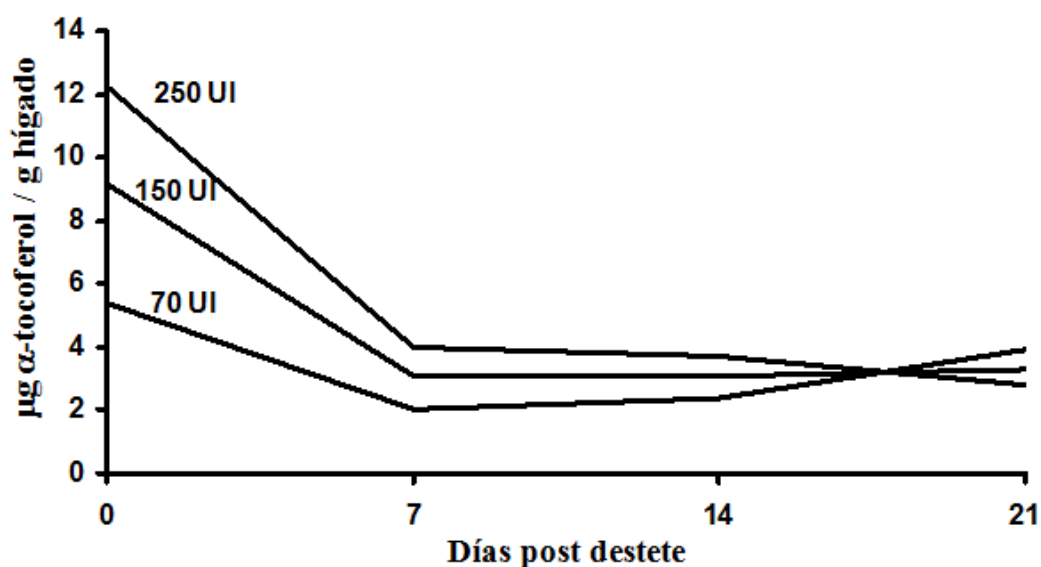
anteriormente, es necesaria la hidrólisis, emulsión y formación de micelas para que se produzca una correcta absorción. Por tanto, resulta interesante incluir grasas en los piensos de iniciación de lechones para favorecer este proceso, además de constituir la fuente principal de energía (debido a la dificultad en estas edades para digerir carbohidratos) y participar en otras muchas funciones orgánicas esenciales como pueden ser su inclusión en las membranas celulares y su participación como precursor de eicosanoides. En este sentido, Moreira y Mahan (2002) observaron que la inclusión de un 5% de grasa en el pienso de iniciación de los lechones tenía un efecto positivo sobre los niveles de α -tocoferol en los animales (*Ilustración II-19*). Sin embargo el efecto de la inclusión de la fuente de grasa no fue capaz de evitar el descenso brusco de la concentración de α -tocoferol que acontece la primera semana post-destete. No obstante, en este experimento se concluyó que la inclusión de una fuente de grasa en el pienso permite reducir la inclusión de vitamina E en la ración desde 80-100 UI/kg hasta 40-60UI/kg, sin reducir la concentración de tocoferol en el suero de los lechones por debajo de 1,5mg/l (estatus satisfactorio). Por otro lado, la adición de aditivos en el pienso como los emulsionantes, pueden resultar interesante para incrementar la digestibilidad de la grasa y la formación de micelas, favoreciendo así la absorción de la vitamina E. Es importante tener en cuenta que cuando se incluye una fuente de grasa rica en ácidos grasos poli-insaturados se incrementan las necesidades de vitamina E, dada la susceptibilidad de este tipo de ácidos grasos a la oxidación.

Ilustración II-19.- Efecto de la concentración de vitamina E (20 vs 60 UI/kg pienso) y la inclusión de grasa añadida en el pienso de lechones destetados en la concentración α -tocoferol en el suero sanguíneo. (Moreira y Mahan, 2002.)



Finalmente, otra de las estrategias nutricionales a tener en cuenta para evitar el descenso brusco de la vitamina E en los lechones tras el destete, consistiría en enriquecer considerablemente el pienso de las madres en esta vitamina al final de la gestación y durante la lactación, muy por encima de las recomendaciones del NRC (1998). Así, dada la elevada capacidad de la cerda para enriquecer el calostro y la leche con vitamina E, podríamos asegurarnos un nivel de partida elevado en los lechones en el momento del destete, de manera que pese a la caída brusca que acontece en las primeras semanas tras el mismo, los niveles de α -tocoferol en suero y tejidos podrían mantenerse en unos niveles razonables para asegurar un correcto estatus oxidativo. La efectividad de esta estrategia es clara (*Ilustración II-20*), pero el elevado consumo de pienso de las cerdas durante la lactación plantea un problema económico difícil de asumir.

Ilustración II-20.- Efecto de la concentración de vitamina E en el pienso de cerdas reproductoras en la concentración de α -tocoferol en el hígado de lechones destetados (Lauridsen y Jensen, 2005).



En conclusión, en el momento del destete, la caída brusca de los niveles de vitamina E en suero y tejidos del lechón unido a la falta de madurez del sistema inmune y el uso de grasas insaturadas incrementa las necesidades en vitamina E para evitar que al animal sufra estrés oxidativo, con las implicaciones negativas que ello conlleva para la salud del animal y la calidad de la carne. Aunque se han probado distintas estrategias nutricionales que han ayudado a solventar en parte este problema, la concentración de α -tocoferol en los lechones en la primera semana tras el destete sigue siendo muy baja. Es por ello por lo que son necesarias investigaciones futuras que ayuden a mejorar el estatus oxidativo del lechón durante esta primera etapa post-destete siendo la alimentación una herramienta clave para conseguir este propósito.

II.3.5.- Recomendación de inclusión de vitamina E en el pienso para cerdos.

La alimentación representa la mayor parte del coste total de la producción porcina. Por este motivo, y con el objeto de poder formular el pienso adecuado, es importante conocer las necesidades nutritivas de los cerdos bajo las diversas condiciones productivas, de modo que se puedan formular para cubrirlas. El hecho de no satisfacer correctamente las necesidades nutritivas de los animales supone un freno productivo con efectos colaterales en el bienestar y salud que deben ser evitados. Por el contrario, niveles excesivos de nutrientes pueden acarrear problemas de toxicidad, resultan antieconómicos y pueden contribuir a la contaminación ambiental.

El NRC (1998), estima en 16 UI/kg de pienso hasta los 10 kg de peso vivo y en 11 UI/kg de pienso hasta los 120 kg de peso vivo. Éstos se consideran como las cantidades mínimas necesarias para prevenir deficiencias y problemas biológicos. Para las cerdas gestantes, lactantes la recomendación asciende a 44 UI/kg.

En una revisión reciente, se ha puesto de manifiesto que existe un amplio rango en la inclusión de vitamina E en el pienso de cerdas (Fraga y Villemoly, 2000; López-Bote, 2002). Mientras unos productores se ajustan a los niveles mínimos recomendados por el NRC (1998) otros optan por incluir cantidades mucho más elevadas, pese al sobre coste que ello implica. Son varias las razones que justifican este aporte mucho más alto que los niveles mínimos recomendados pese al coste que supone. De una parte, existe un beneficio adicional sobre la salud y productividad de los animales al recibir un aporte vitamínico superior a las necesidades mínimas, lo que justifica por sí solo sobradamente la tendencia creciente a aumentar la concentración de vitaminas en el pienso. Por otra parte, la suplementación en exceso sirve para compensar las variaciones que pueden darse en la práctica (distinta disponibilidad según el alimento, pérdidas en tratamientos por calor, en almacenamiento, variaciones en el consumo de pienso, cambios de manejo, calidad ambiental, estado sanitario, etc.) (Hernández et al., 2002).

Además, existen varios argumentos que indican la necesidad de revisar periódicamente las recomendaciones de vitaminas en ganado porcino. Entre otros, cabe destacar los siguientes:

Buena parte de las recomendaciones vitamínicas se expresan en concentración por kilogramo de pienso. En la especie porcina, los cambios provocados por la mejora genética orientada a reducir el índice de transformación, vienen produciendo durante las últimas décadas un marcado efecto indirecto en el consumo reduciendo la ingestión voluntaria.

Simultáneamente se ha producido un marcado aumento en la capacidad productiva de los animales. Es probable que en las proximidades al límite productivo deba prestarse más atención a los aportes de los diferentes nutrientes para evitar desequilibrios. Además, aspectos como la respuesta inmune, la longevidad de los reproductores, la viabilidad de los lechones, la adaptación al estrés, la respuesta a vacunaciones, la susceptibilidad a problemas patológicos, etc., merecen una atención cada vez mayor en la porcicultura moderna, y no han sido hasta el momento evaluados con suficiente profundidad (López-Bote, 2002). Por ello sería importante suministrar niveles concretos de vitaminas en función del aspecto evaluado.

En los últimos años el consumidor está adquiriendo protagonismo en el proceso productivo, primando muchas veces la calidad y propiedades beneficiosas para la salud de los productos pecuarios. Por ello, una óptima nutrición vitamínica ofrece una alternativa interesante para la obtención de productos de calidad, que debería estudiarse y explotarse adecuadamente.

La administración de la vitamina E en el pienso en cantidades elevadas respecto a la recomendación mínima tiene una relación positiva sobre algunos parámetros productivos tal y como demuestran Pierce et al. (2005). En caso de las madres se han establecido una relación positiva entre la administración de vitamina E y el número de lechones nacidos. Pero el interés de la vitamina E en esta categoría de cerdos va mucho más allá en la mejora de la productividad, existe también una relación positiva entre la administración de vitamina E y algunas patologías post-parto como la retención placentaria. Este interés no se limita solo en este periodo sino que se prolonga hasta el final de la lactación e incluso hasta la etapa de crecimiento de los cerdos (López Bote, 2002).

En el caso de los lechones que se encuentran en un periodo delicado de vida en el que el animal puede presentar problemas patológicos. El interés de incluir niveles elevados de vitamina E en pienso de lechones se manifiesta. Varios estudios han demostrado que al incluir dosis elevada de vitamina E en piensos de lechones mejora la respuesta inmune (Lauridsen y Jensen, 2005) y se observa un más elevado título de anticuerpos.

Respecto a los cerdos en crecimiento se han observado algunos beneficios respecto a los parámetros zootécnicos y sobre la calidad de la carne. En investigaciones recientes sobre la acumulación de vitamina E se han empleado cantidades muy variables, si bien en la mayoría de los casos se han incluido 100 y 200 mg de dl- α -tocoferol acetato/kg de pienso, alcanzándose los mayores beneficios frente a la oxidación de la carne y productos cárnicos en los animales que recibieron 200 mg/kg de pienso (Lauridsen *et al.*, 1999; Buckley *et al.*, 1995). Las variaciones en la acumulación de vitamina E según la duración del periodo de administración y otras características de la ración para la suplementación de 200 mg/kg de pienso

La sintomatología de una deficiencia en vitamina E en los animales como el ganado porcino se manifiesta con una debilidad muscular, degeneración muscular (miopatía), hepatosis, descoloración del tejido adiposo edema e incluso muerte súbita. Se puede también notar un incremento en la frecuencia y severidad de infecciones bacterianas, protozoarias y virales (Lauridsen y Jensen, 2005).

II.3.6.- Formas comerciales de vitamina E.

En la naturaleza la vitamina E se encuentra ampliamente distribuida en el reino vegetal, siendo los aceites vegetales su principal fuente (Wilburn et al., 2008). Por lo que prácticamente todos los alimentos de origen vegetal tienen cantidades apreciable de vitamina E. Debido a su ubicuidad, los animales que reciben alimentos frescos ingieren cantidades suficientes de esta vitamina y no necesitan por tanto un aporte adicional. Sin embargo, como se ha indicado anteriormente, la vitamina E es un producto muy lábil deteriorándose enormemente durante el procesamiento tecnológico asociados la elaboración de pienso compuesto que implican frecuentemente molienda, calentamiento, almacenamiento etc.

Por lo tanto debido al carácter extremadamente lábil de la molécula se hace necesario incorporar vitamina E a los piensos de los cerdos producidos en condiciones intensivas y alimentados con piensos compuestos.

El α -tocoferol es el isómero más activo de la familia de los tocoferoles en su actividad vitamínica. Es la forma más abundante en los tejidos animales y está disponible comercialmente para la alimentación animal al haber sido sintetizado químicamente. El α -tocoferol sintético, denominado dl- α -tocoferol, no es una única forma química sino una mezcla de estereoisómeros preparados comercialmente a partir de TMHQ (tetrametil-hidroquinona). Es más estable que la forma alcohol en el procesamiento y conservación de los alimentos y piensos (Shahidi et al., 1992). Por lo tanto la forma comercial de la vitamina E, principalmente incluida en los piensos, es la forma sintética (*Ilustración II-21*) llamada acetato α -tocoferol o dl- α -tocoferol.

Debido al hecho que la forma sintética está muy extendida, se considera el compuesto de referencia para establecer el concepto de unidad internacional para cuantificar el concepto de actividad biológica. Se considera que una UI equivale a 1 mg de acetato dl- α -tocoferol. Todas las demás formas tocoferoles o presentaciones comerciales deben referenciarse a esta actividad, expresando su actividad relativa respecto a este producto.

La vitamina E se presenta en la naturaleza en una única forma natural, RRR- α -tocoferol que generalmente se encuentra en los vegetales. La fuente natural de vitamina E difiere químicamente, y fisiológicamente de la fuente sintética ya que éste es una mezcla de 8 isómeros (all-racc- α -tocoferol) en proporciones iguales pero también cada uno de los isómeros tiene su actividad biológica propia (Wilbum et al., 2008). Es curioso ver que ya sea la forma natural o la forma sintética de la vitamina E todas tienen la actividad antioxidante relativamente similar aunque el organismo prefiera incorporar la vitamina E en su forma natural (Traber y Atkinson, 2007; Lauridsen et al., 2002).

Tabla II-5.- Actividad biológica relativa de las diferentes formas de los tocoferoles (Adaptado a partir de Bender, 2003)

Forma	Bioensayo de reabsorción fetal		Unión con α -TTP
	UI/mg	Actividad relativa	
α -tocoferol	1.49	1.0	1.0
β -tocoferol	0.75	0.50	0.38
γ -tocoferol	0.15	0.10	0.09
δ -tocoferol	0.05	0.03	0.02

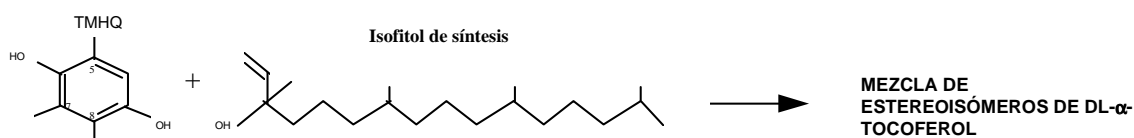
Tabla II-6.- Actividad biológica relativa de las diferentes formas de los tocotrienoles (Adaptado a partir de Bender, (2003)

Forma	Bioensayo de reabsorción fetal		Unión con α -TTP
	UI/mg	Actividad relativa	
α -tocotrienol	0.75	0.50	0.12
β - tocotrienol	0.08	0.05	---
γ - tocotrienol	---	---	---
δ - tocotrienol	---	---	---

La obtención de la vitamina E sintética se hace a través de un proceso químico a nivel industrial. Para ello se emplean compuestos derivados del petróleo. Inicialmente se usaron la tetrametil-hidroquinona y el fitol, en presencia de ácido propiónico, y el ácido acético (para la forma acetilada). Originalmente, el 2-ambo- α -tocoferil acetato fue la forma internacional para la vitamina E sintética (Ames, 1979).

En la actualidad, para la síntesis de la forma sintética, se sustituyó el fitol por el iso-fitol, lo que dio como resultado el actual all-rac- α -tocoferil acetato con ocho estereoisómeros (RRR, RRS, RSR, RSS, SRR, SRS, SSR, SSS), aunque se siguió y se sigue llamando comúnmente dl- α -tocoferil acetato, lo que crea confusiones respecto a las equivalencias entre los diferentes compuestos (*Ilustración II-21*).

Ilustración II-21.- Síntesis del dl-all-rac- α -tocoferol



El isómero que mayor actividad biológica tiene es sin duda el isómero RRR α -tocoferol. El α -tocoferol natural se absorbe en su forma como alcohol libre mientras que la forma acetato debe que ser hidrolizado antes de ser absorbido en el intestino delgado (Lauridsen et al., 2007). Por lo tanto la forma natural tiene mayor actividad biológica que la forma sintética.

Tabla II-7.- Actividad biológica relativa de las diferentes formas de α -tocoferol Adaptado a partir de (Bender 2003)

Forma	Bioensayo de reabsorción fetal	Unión con α -TTP
	UI/mg	
acetato		
RRR- α -tocoferilo-acido	1.21	0.81
sucinato		
all-rac- α -tocoferol	1.10	0.74
all- rac- α -tocoferilo	1.00	0.67
acetato		
all-rac- α -tocoferilo	0.89	0.60

III. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

III. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

La vitamina E es un nutriente importante para la salud de los animales. Debido a su potente acción antioxidante protege a las células del daño oxidativo ejerciendo de este modo un efecto positivo en distintos órganos y sistemas del organismo (Mahan et al., 2000).

La vitamina E administrada a diferentes concentraciones en el pienso, contribuye a diversas funciones beneficiosas en los lechones. Los niveles requeridos para la suplementación en vitaminas en general resulta ser un tema muy complicado debido a las complejas interacciones que condicionan su absorción y eficacia biológica. En la formulación de los piensos en alimentación animal, la forma de vitamina E mayoritariamente utilizada para suplementar a los animales ha sido la forma sintética (all-rac- α -tocoferol acetato). Sin embargo, ésta difiere de la forma natural tanto en su estructura como en su actividad biológica. Así, mientras la vitamina E sintética (all-rac α -tocoferol) está constituida por una mezcla de 8 estereoisómeros con distinta actividad biológica, la forma natural posee una única forma estereoisomérica (RRR- α -tocoferol).

En el caso de la especie porcina, debido a que la estructura de la placenta no permite una transferencia entre madre y lechones (Pinelli-Saavedra et al., 2008) los lechones nacen con una concentración baja de vitamina E y por ende están predispuestos a contraer diversas infecciones. En un estudio Lauridsen et al. (2007) demostraron que la vitamina E juegan un importante papel en el desarrollo y maduración del sistema inmune (Lauridsen et al 2011). Por lo que se hace esencial la transferencia a través del calostro y de la leche de las madres a los lechones recién nacidos.

Por otro lado, debido a la baja eficiencia digestiva de los preparados comerciales del all-rac- α -tocoferol acetato, los lechones destetados sufren una disminución importante del nivel de vitamina E en el suero (Lauridsen et al., 2002), lo que produce una incapacidad para mantener el estatus oxidativo y por tanto una mayor vulnerabilidad a padecer enfermedades. En los últimos años se han diseñado varias estrategias para minimizar esta

disminución de vitamina E y sus posibles efectos sobre el estado de salud de los lechones (Lauridsen y Jensen, 2005).

Estudios realizados por Lauridsen et al. (2002) han demostrado que los lechones lactantes incorporan con más eficiencia la forma natural frente a la forma sintética (Hoppe y Krennrich, 2000), debido a la discriminación de las distintas formas estereoisoméricas por la proteína de transferencia del tocoferol (Hosomi et al., 1998). Dicha equivalencia entre la vitamina E natural y sintética se ha propuesto que tiene una relación 2:1 en el lechón lactante (Lauridsen et al., 2002), lo que implica una mayor eficiencia de utilización de la forma natural. El factor biopotencial oficial basada en el resultado la prueba de resorción-gestación en ratas para 1.00 all-rac- α -tocopherol acetato es 1.36 respecto a la forma RRR- α -tocopherol acetato (Meglia et al., 2005). Mahan et al. (2000) encontraron durante los periodos de gestación y la lactación, concentraciones altas de tocoferol en calostro y leche cuando la fuente de vitamina E utilizada fue la forma natural. Estos autores también demostraron niveles de tocoferol más elevados tanto en suero como en hígado a los 21 días de edad en lechones que provienen de madres que han consumido piensos suplementados con vitamina E natural.

Entre las estrategias para evitar el descenso de tocoferol en el plasma de lechones después del destete cobra especial importancia la suplementación de las raciones de las madres para que el tocoferol llegue a través del calostro y de la leche como lo han demostrado algunas investigaciones (Mahan et al. 2000; Pinelli-Saavedra et al., 2008) pero esto supondría mucho coste cuando analizamos el consumo diario de las cerdas tanto de pienso como de agua respecto a las recomendaciones de la NRC (1998) en las etapas de gestación y lactación, lo que exige profundizar en el estudio de estrategias nutricionales efectivas y razonables desde el punto de vista técnico-económico. Después del destete, los lechones comienzan a alimentarse por sí mismos, por lo que otra estrategia a tener en cuenta sería la suplementación de los piensos de iniciación, pero resulta importante conocer que en el momento del destete, a causa del stress que se produce en esta etapa, el lechón presenta notablemente disminuída su capacidad de ingestión (Torrey et al., 2008; Wilburn et al., 2008; Dong y Pluske, 2007). Por lo tanto la vitamina E no se aprovecha como esperaríamos

y como consecuencia observamos una disminución de los niveles de tocoferol en suero y reservas en los tejidos, con importantes consecuencias en su salud, rendimientos productivos, etc., lo que podría suponer grandes pérdidas económicas. Por otra parte, el consumo del agua en dicha etapa de la vida del cerdo se mantiene y se estima que este consumo representa el doble de lo que el lechones normalmente consumen de pienso (Dong y Pluske, 2007; Torrey et al., 2008). Ello ha desencadenado el interés por la búsqueda de otras estrategias que eviten dicho descenso. En este sentido Wilburn et al. (2008) ha propuesto el agua de bebida como una vía eficaz para incrementar los niveles de tocoferol durante el post-destete, puesto que el consumo de agua no se ve tan severamente afectado (Steidinger et al., 2003). Además dichos autores demostraron que a altas concentraciones (50, 100 y 150 IU/l) la vitamina E natural en el agua de bebida también resultó ser más eficaz que la sintética en pienso estimando un ratio agua: pienso incluso inferior a 2, no existiendo más estudios sobre el tema.

Por lo tanto, a partir de estas ideas planteadas inicialmente nuestras hipótesis están resumidas en los siguientes apartados:

1. La utilización del agua de bebida como vía de administración de la vitamina E natural a los lechones destetados puede ser una alternativa eficaz para mantener o aumentar el nivel de tocoferol tisular en los lechones destetados.
2. El uso de la vitamina E natural puede llegar a ser más eficaz que la forma sintética en la producción porcina.
3. La administración en el agua de bebida de la vitamina E natural a las madres antes y después del parto puede mejorar la concentración de tocoferol en suero de los lechones.

Con el objetivo de verificar las hipótesis anteriormente planteadas, se han desarrollado en esta presente tesis doctoral tres estrategias experimentales para estudiar el efecto de aportar vitamina E en forma natural en el agua de bebida o vitamina E sintética en el pienso a diversas concentraciones sobre la acumulación de α -tocopherol en suero de cerda y en

distintos tejidos de lechones antes y después del destete con el objeto de tratar de establecer una dosis eficaz que permita optimizar la acumulación de tocoferoles y mejorar el estatus oxidativo de los lechones.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

IV.1.- Material

IV.1.1.- Reactivos

Los productos químicos (reactivos y/ o disolventes) utilizados durante la fase experimental de este trabajo, fueron de calidad analítica y se obtuvieron de las firmas comerciales PANCREAC y SIGMA-Aldrich. Los disolventes utilizados en la fase móvil de la cromatografía líquida fueron de calidad HPLC y el agua de calidad Milli-Q.

El patrón de vitamina E, DL-all-rac- α -tocoferol (T3251-5G), utilizado como estándar se obtuvo de la firma comercial SIGMA-Aldrich con una pureza del 96%.

Los gases empleados en cromatografía de gases: Nitrógeno comprimido ALPHAGAZ™ N2 2 B50, Hidrógeno comprimido 1 B50 y Aire sintético comprimido ALPHAGAZ™ Aire. 1, se adquirieron en Air Liquide (todos con una pureza del 99.9999 %).

IV.1.2.- Aparatos

Las pesadas de precisión en el laboratorio se llevaron a cabo en una báscula analítica AND Modelo HR-200, que tiene una capacidad máxima de pasada hasta 210 g con una d=0,1 mg.

Para la evaporación de los solventes empleados en los análisis utilizamos un evaporador de marca VLM GmbH 33689 Bielefeld, modelo V659-061.820 equipado de un termo-bloque de acero con una capacidad de 48 viales. Para catalizar la evaporación de los productos, empleamos una temperatura de 30°C. El nitrógeno empleado se generó a partir de un generador de nitrógeno de modelo NiGen Micro.

La determinación del pH se realizó con un pH-metro de marca CRISON Modelo 507 con un electrodo Cat. # 52-00.

La homogeneización de las muestras de hígado, se llevó a cabo en un homogeneizador T-18 Basic ultraturax de marca IKA®. La homogeneización previa extracción de vitamina E se llevo a cabo en Vortex Genie 2 de marca Scientific industria

La incubación de las muestras, tanto para el análisis de vitamina E como al inducir la oxidación de los distintos tejidos, se realizó en un baño con agitación máxima U/min 108 de marca Selecta unitronic.

Las centrifugaciones se realizaron en una centrífuga refrigerada: HERMLE LABOATECHNIK GmbH Siemmess TR 25 D-78 564 Wehngen modelo Z383K Nr31 (Alemania). Las centrifugaciones de pequeño volumen se llevaron a cabo en una centrífuga refrigerada SIGMA modelo 3K10.

Para el análisis de las inmunoglobulinas empleamos un agitador de placa de marca IKA® MTS 2/4. Su agitación máxima es de 1100 rpm. Para la agitación de tubos se utilizó un agitador de tubos con accesorio para los tubos de marca IKA®- werke typ Vx2.

La vitamina E de los piensos, del calostro, de la leche, del suero, del músculo, de la grasa, y del hígado se analizó mediante un HPLC Agilent technologies serie 1100, equipado con un inyector automático G1313A, una bomba cuaternaria, un desgasificador G1378A, un detector DAD, G1315B, y una columna Lichrospher® 100 de fase reversa RP-18 (250 x 4mm de diámetro interno, 5 µm de tamaño de partícula). La integración y registro de los cromatogramas se realizó individualmente en cada caso utilizando un ordenador HEWLETT PACKARD modelo Vectra 486/33 VL, mediante el programa de HEWLETT PACKARD ChemStation, (versión A.03.01).

Para el análisis de la vitamina E del calostro, de la leche y del suero se utilizó un detector de fluorescencia serie 1200, G1321A.

Para el análisis de los estereoisómeros empleamos una columna Chiral ® OJ-H a una temperatura 25°C. El flujo que se utilizó fue 1 ml/min.

Para la cuantificación de la oxidación lipídica y/o del estrés oxidativo e inmunoglobulinas, la lectura de las muestras se realizó en un espectrofotómetro UNICAM 8625 UV/VIS.

IV.1.3.- Biológicos

Para la para el primer y el segundo ensayo se utilizaron cerdos blancos. Los lechones provinieron de un cruce entre cerda híbrida Large-White x Landrace con un verraco Piétrain. El destete se llevó a cabo a los 28 días de edad.

Para la realización del tercer ensayo se utilizaron cerdas de raza ibérica procedentes de la empresa Ibéricos de Arauzo, S.A., (Zorita de la Frontera, Salamanca, España). Los lechones se obtuvieron de un cruce con verracos Duroc.

IV.2.- Métodos.

IV.2.1.- Ensayo 1

IV.2.1.1.- Objetivo

Estudiar el efecto de la suplementación de vitamina E natural en el agua de bebida en cerdas reproductoras o lechones destetados.

IV.2.1.2.- Diseño experimental

Madres

El estudio se llevó a cabo en la granja perteneciente a la empresa (Ibéricos de Arauzo, SA), Zorita de la Frontera, Salamanca, España). Esta granja incluye unas 2.500 reproductoras. En la granja se practica un manejo en bandas de producción semanales con destetes de 3 semanas y castración física tan solo en los machos. El sistema de alimentación en los cebaderos es alimentación líquida en el 100 % del efectivo propio y el agua se distribuye mediante un sistema dosificador (Sojet, lda, Portugal). Las reproductoras de esta granja son ibéricas retintas certificadas inscritas en libro genealógico en ciclo abierto y cruzadas con Duroc L16.

Para el experimento se utilizaron cuarenta y ocho cerdas en gestación que fueron distribuidas aleatoriamente en dos grupos de veinticuatro cerdas cada uno. Los dos grupos recibieron idéntica dieta que incluía 100 mg de all-rac-acetato de α -tocoferol/kg de pienso y uno de ellos se suplementó adicionalmente con α -tocoferol naturales (acetato de α -tocoferol hidrosoluble) en el agua de bebida (*Tabla IV-1*).

Tabla IV-1.- Consumo diario de vitamina E sintética (acetato de all-rac-alfa-tocoferol) en el pienso y natural (alfa-tocoferol soluble) en el agua de bebida de las cerdas experimentales durante la lactación.

Tratamiento	Vitamina E sintética (mg/día)	Vitamina E Natural (mg/día)
1	500	---
2	500	52,5

La vitamina E natural añadida en el agua de bebida para madres y lechones fue una emulsión de acetato α -tocoferol hidrosoluble de 70 mg de la RRR- α -tocoferol / g (H2E).

Tabla IV-2.- Ingredientes (%) y composición calculada de los piensos administrados a las cerdas durante la lactación

MATERIAS PRIMAS (%)	Lactación
Cebada	55,5
Trigo	10,0
Harina soja 44	12,0
Soja integral	2,5
Salvado de trigo	5,0
Pulpa de remolacha	5,0
Melazas de caña	2,0
Manteca de cerdo	3,0
Carbonato cálcico	0,7
Fosfato bicálcico	1,6
Sal	0,5
L-lisina líquida 50	0,1
Sepiolita	1,0
Corrector ¹	0,5
COMPOSICIÓN CALCULADA (%)	
Materia seca	89,91
Ceniza	7,15
Proteína bruta	15,04
Grasa bruta	5,14
Fibra bruta	5,21
Lisina	0,75
EN (kcal/kg)	2190

¹Corrector: Vitamina A: 10,000 UI/kg, Vitamina D3: 2000 UI/kg, Vitamina E (all-rac-acetato de α -tocoferol): 100 mg/kg, Fe (Sulfato monohidrato): 0.00684 g/kg, Cu (Sulfato pentahidratado): 4.008975 g/kg, k: 6.7997 g/kg, Mg: 0.098 g/kg, biosaf SC-47: 0.1%.

Las cerdas experimentales se seleccionaron con un peso próximo a 185 kg en el momento del inicio de la gestación y se escogieron entre el tercer y quinto parto. El destete se produjo a los 21 días de edad. El estudio comprendió desde los 107 días de gestación hasta los 21 días de lactación.

Se realizaron los siguientes controles generales y recolección de muestras:

Peso vivo y consumo

Análisis de los piensos.

Muestras de suero de las madres. A los 107 días de gestación y a los 5 y 20 días tras el parto se tomaron muestras de sangre de la vena yugular y tras la obtención del suero se determinó la concentración de α -tocoferol.

Leche de las madres. A los 20 días del parto se recogió leche y se analizó el contenido en tocoferol. Para ello se obtuvieron 5 ml de leche de un número representativo de cerdas (n = 4 por tratamiento) por ordeño manual.

Lechones

Tras el destete, se procedió a hacer adopciones para igualar el número de lechones por camada, siempre entre cerdas del mismo tratamiento. La duración de ensayo en esta etapa fue 20 días a partir del destete. En la (*Tabla IV-3*) se muestran los ingredientes y composición química de los piensos de lechones al destete.

Tabla IV-3.- Ingredientes (%) y composición calculada de los piensos administrados a los lechones desde el destete a los 42 días de edad.

MATERIAS PRIMAS (%)	28-42 días
Maíz extrusinado.	22,6
Trigo extrusinado.	30,0
Trigo.	15,0
Harina soja extr.	12,9
Harina pescado LT	6,0
Suero dulce	5,6
Plasma porcino	2,0
L-Lysina	0,51
L-Treonina	0,17
DL-Metionina 99 %	0,15
Carbonato cálcico	0,68
Aceite de soja	1,10
Proteína de cerdo hidrolizada	1,0
Ácido orgánico	0,50
Aromatizantes (Luctarom 54770Z)	0,10
Sal	0,25
Corrector ¹	
COMPOSICIÓN CALCULADA %	
Materia seca	90,65
Cenizas	5,19
Proteína bruta	18,98
Grasa bruta	5,86
Fibra bruta	2,38
Lisina	1,52
Metionina	0,59
EN (Kcal/kg)	2425

¹Corrector: vitamina A: 10.000, UI/kg; vitamina D3: 2.000 UI/kg; vitamina E (all-rac-acetato α -tocoferol) 150 mg/kg; Co (Carbonato básico cobaltoso monohidratado): 0,30 mg/kg; Cu (Quelatocuprico de aminoácido hidratado): 8,33 mg/kg; Cu (Sulfato cúprico pentohidratado): 120,9 mg/kg; Fe (Carbonato ferroso): 63,75 mg/kg; Fe (Quelato de aminoácidos hidratado): 41,01 mg/kg I (Iodo potásico): 2,0 mg/kg Mn (Manganeso (Óxido de manganeso): 75,0 mg/kg; Se (Selenito sódico): 0,30 mg/kg; Zn (Óxido de zinc): 70,41 mg/kg.

Tras el destete, los lechones provenientes de los dos grupos de cerdas se distribuyeron en dos subgrupos, de modo que uno de ellos recibió suplementación por agua de α -tocoferol natural (5 mg por lechón y día) y el otro no recibió suplementación. Todos los lechones recibieron idéntico pienso (con 150 mg all-rac- α -tocoferol/kg pienso). Este diseño factorial dio lugar por tanto a cuatro grupos experimentales:

M-Ctrol_L-Ctrol: Lechones provenientes de cerdas sin suplementar, que no fueron suplementados tras el destete

M-Ctrol_L-Sup: Lechones provenientes de cerdas sin suplementar, que si fueron suplementados tras el destete

M-Sup_L-Ctrol: Lechones provenientes de cerdas suplementadas, que no fueron suplementados tras el destete

M-Sup_L-Sup: Lechones provenientes de cerdas suplementadas, que si fueron suplementados tras el destete

Se realizaron los siguientes controles generales y recolección de muestras:

Rendimientos productivos: pesaje individual y de pienso con el fin de valorar la ganancia de peso, consumo medio diario de alimento e índice de conversión.

Análisis de los piensos.

Muestras de suero de los lechones. En el momento del destete (28 días) y a los 5 y 20 días tras el destete se tomaron muestras de sangre de la vena yugular y tras la obtención del suero se determinó la concentración de α -tocoferol y la estabilidad oxidativa, así como otras determinaciones.

IV.2.2.- Ensayo 2

IV.2.2.1.- Objetivo

Estudiar el efecto de la sustitución de vitamina E sintética en el pienso de cerdas reproductoras o lechones destetados por formas naturales de vitamina E administrada en el agua de bebida (a una concentración igual o equivalente a la tercera parte de la forma sintética) sobre la concentración de tocoferol en el suero de la madre, la leche, el calostro y en el suero del lechón destetado.

IV.2.2.2.- Diseño experimental

Madres

El experimento se realizó en la granja experimental CEP (Centro de Experimentación y Formación en Porcino) situada en la localidad Aguilafuente en Segovia. Es una granja experimental especialmente diseñada para el desarrollo de pruebas experimentales en condiciones de campo. Esta granja incluye unas 550 cerdas reproductoras y la fase de lechonerías. En la granja se practica un manejo en bandas de 3 semanas, por lo que las cerdas están divididas en grupos de 60-70. La granja utiliza un sistema de alimentación automatizado. En la fase de gestación, las cerdas están alojadas en jaulas individuales durante el primer tercio de la gestación. Durante el resto de la gestación las cerdas estuvieron alojadas en grupo de 60-70. Para ello la granja dispone de cuatro naves, cada una de ellas con una estación de alimentación que controla electrónicamente el aporte de pienso por cerda. Cada cerda estaba identificada con un chip electrónico. A los 107 días de gestación, las cerdas pasaron a la nave de lactación, que incluye 8 salas idénticas con 12 plazas cada una. El destete se realizó a los 28 días.

El día 107 de gestación correspondió con el día 0 experimental. Para el estudio se utilizaron 36 cerdas, distribuidas en 3 salas de lactación (12 cerdas / sala). El ensayo se diseñó en bloques al azar con 3 tratamientos en base a la suplementación con vitamina E natural en

agua de bebida incluyendo un grupo control negativo (con aporte de vitamina E en el pienso, en su forma sintética) (**Tabla IV-4**). A los 107 días las cerdas pesaron como promedio 250 kg (\pm 8,98). A los 25 días de lactación, casi al destete pesaron 210 kg (\pm 8.85). En todos los casos se trataba de cerdas de tres o más partos. El estudio comprendió desde la última semana de gestación (107 días) hasta los 28 días de lactación.

Tabla IV-4.- Consumo diario de vitamina E sintética (acetato de all-rac-alfa-tocoferol) en el pienso y natural (alfa tocoferol soluble) en el agua de bebida de las cerdas experimentales durante la lactación.

Tratamiento	Vitamina E sintética (mg/día)	Vitamina E Natural (mg/día)
T1- vit E sintética ^a	150	...
T2- nat -1/1 ^b	...	150
T3 nat-1/3 ^c	...	50

Cálculos realizados teniendo en cuenta que cada mL de producto contiene 70 mg de Vitamina E.

^a*Expresado como mg/kg pienso (estimando como media que comen 5kg al día)*

^b*Equivale a 2,142 mL de producto/cerda y día*

^c*Equivale a 0,714 mL de producto/cerda y día*

Al igual que el ensayo anterior, la vitamina E natural añadida en el agua de bebida para madres y lechones fue una emulsión de acetato α -tocoferol hidrosoluble de 70 mg de la RRR- α -tocoferol / g (H2E- Vitapherole-E 7% de FG, VitaeCaps, SA, Talavera de la Reina, Toledo, España).

Tabla IV-5.- Ingredientes (%) y composición calculada de los piensos administrados a las cerdas durante la gestación y lactación

MATERIAS PRIMAS (%)	Gestación	Lactación
Cebada	36,0	36,3
Maíz	12,0	12,0
Trigo	5,0	5,0
Harina soja 44	7,8	15,0
Salvado de trigo	25,0	20,0
Pulpa de remolacha	10,0	5,0
Melazas	1,0	1,0
Manteca 1,5	1,2	2,8
Carbonato cálcico	1,01	0,99
Fosfato bicálcico	0,19	0,82
Sal	0,41	0,50
L-lisina líquida 50		0,16
Metionina líquida		0,01
Cloruro de colina	0,03	0,03
Enzimas	0,10	0,10
Corrector ¹	0,30	0,30
COMPOSICIÓN CALCULADA %		
Proteína bruta	14,0	16,5
Grasa bruta	3,3	5,1
Fibra bruta	6,3	5,7
Cenizas	5,4	6,0
Lisina	0,6	0,9
EN (kcal/kg)	2045	2155
COMPOSICIÓN ANALIZADA		
Vitamina E (µg/g α-tocoferol) ²		33,31

¹Vitamina A: 9.000,00 IU; Vitamina D3: 1.750,00 IU; Vitamina E (all rac acetato de α-tocoferol): 30,00 mg; Vitamina B1: 1,0 mg; Vitamina B2: 3,50 mg; Vitamina B12: 0,02 mg; Vitamina B6: 0,50 mg; Ácido nicotínico: 30,00 mg; Biotina: 0,05 mg; Ácido pantoténico: 10,0 mg; Vitamina K3: 0,5 mg; Cloruro de colina: 200,00; Fe (Carbonato ferroso): 50,00 mg; Cu (Sulfato pentahidratado): 15,0 mg; Co (Sulfato heptahidratado): 0,45 mg; Zn (Óxido): 90,00 mg; Mn (Sulfato monohidrato): 35,00 mg; I (Yoduro potásico): 0,5 mg; Se (Selenito sódico): 0,0675 mg; 6-fitasas EC 3,1,3,26: 750,00 FTU; BHT y etoxiquin E 324: 0,1 mg.

² Los grupos que recibieron vitamina E natural en el agua de bebida se formularon con un corrector idéntico, pero carente de vitamina E (all-rac-α-tocoferol). La concentración analizada en ese pienso fue de 9,18 µg de α-tocoferol/g de pienso.

Se establecieron tres grupos experimentales que difieren exclusivamente en el aporte de vitamina E. El grupo Control recibió vitamina E sintética en el pienso (33,31 mg/kg). Los grupos que recibieron vitamina E natural en el agua de bebida se alimentaron con un pienso sin vitamina E sintética añadida. La cantidad de vitamina E natural aportada en el agua de bebida a estos dos grupos se calculó para que fuera la equivalente a un ratio 1/1 (NAT 1/1) o 1/3 (NAT 1/3) respecto al grupo control (que recibió vitamina E sintética en el pienso).

Se realizaron los mismos controles experimentales planteados en el ensayo # 1.

Lechones

El destete se realizó en la misma granja comercial detallada anteriormente. La nave para lechones dispone de 7 salas idénticas con 24 corralinas cada una con capacidad para alojar a 6 lechones. Las salas incluyen tres circuitos de agua, con el fin de poder administrar de forma simultánea 3 productos en agua de bebida en los diferentes corrales de cada sala. Tras el destete, se procedió a hacer adopciones para igualar el número de lechones por camada, siempre entre cerdas del mismo tratamiento. La duración del ensayo en esta etapa fue 14 días a partir del destete. Los lechones iniciaron la misma con un peso promedio de 6,67 kg y el peso al final del ensayo fue alrededor de 8,803 kg. Los lechones recibieron un pienso pre-estárter formulado por PigCHAMP Pro Europa, S.A cuya composición se presenta en la (*Tabla IV-6*).

Tabla IV-6.- Ingredientes (%) y composición calculada de los piensos administrados a los lechones desde el destete (28 días) a 42 días de edad.

MATERIAS PRIMAS (%)	28-42 días
Cebada	22,7
Maíz	23,5
Trigo	10,0
Soja Extr.	10,0
Harina soja 44	8,0
Harina pescado	7,6
Suero ácido	12,5
Manteca	2,6
L-Lysina	0,77
L-Treonina	0,17
DL-Metionina 99 %	0,22
Carbonato cálcico	0,76
Fosfato dicálcico	0,67
Sal	0,15
Corrector ¹	0,50
COMPOSICIÓN CALCULADA %	
Materia seca	90,0
Cenizas	5,5
Proteína bruta	20,0
Fibra bruta	2,8
Extracto etéreo	7,1
Lactosa	8,0
Calcio	0,8
Almidón	32,0
Fósforo total	0,67
Fósforo disponible	0,40
Lisina	1,50
Lisina digestible	1,35
EN (Kcal/kg)	2510

¹Vitamina A: 6.000,00 IU; Vitamina D3: 12.000,00 IU; Vitamina E (all rac acetato de α -tocoferol): 12,5 mg; Vitamina B1: 0,5 mg; Vitamina B2: 2,0 mg; Vitamina B12: 0,012 mg; Vitamina B6: 1,0 mg; Ácido nicotínico: 12,0 mg; Ácido pantoténico: 6,0 mg; Cloruro de colina: 100,0; Fe (Sulfato monohidrato + carbonato ferroso): 70,0 mg; Cu (Sulfato pentahidratado): 20,0 mg; Co (Sulfato heptahidratado): 0,42 mg; Zn (Óxido): 75,00 mg; Mn (Sulfato monohidrato+óxido): 35,0 mg; I (Yoduro potásico): 0,4 mg; Se (Selenito sódico): 0,112 mg; 6-fitasa EC 3,1,3,26: 500,0 FTU; BHT y etoxiquín E 324: 0,3 mg.

Tras el destete, la totalidad de lechones que forman parte de los tres tratamientos recibieron el mismo pienso. El consumo fue de 3,33 mg de vitamina E sintética por lechón y día aproximadamente.

En consecuencia, en esta etapa se mantuvieron los mismos grupos experimentales. Al recibir idéntico pienso tras el destete, la única diferencia entre grupos se limita a los tratamientos recibidos por las madres al igual de la gestación y durante la lactación. Los tres grupos experimentales de lechones fueron por tanto los siguientes:

CONTROL: lechones provenientes de las madres suplementados con la forma sintética

NAT-1/1: lechones procedentes de cerdas que se suplementaron vitamina E natural en el agua de bebida a la misma dosis que el grupo control.

NAT-1/3: lechones procedentes de cerdas suplementadas con vitamina E natural en el agua de bebida a una dosis 3 veces inferior a la equivalente de la forma sintética.

Los controles experimentales fueron semejantes a los descritos en el ensayo # 1. La toma de muestra de sangre se realizó en 12 lechones por tratamiento a los 28, 35 y 42 días de vida. La diferentes muestras se mantuvieron conservadas a -20°C hasta su análisis.

IV.2.3.- Ensayo 3

IV.2.3.1.- Objetivo

Estudiar el efecto de la sustitución de vitamina E sintética en el pienso de cerdas reproductoras o lechones destetados por formas naturales de vitamina E administrada en el agua de bebida sobre la concentración de tocoferol y estabilidad oxidativa del lechones destetados.

IV.2.3.2.- Diseño experimental

Madres

El experimento se realizó en la granja experimental CEP (Centro de Experimentación y formación en Porcino) situada en la localidad Aguilafuente en Segovia con las características semejantes a las expuestas en el ensayo # 2. Coincidiendo en ambos ensayos el día 0 experimental con el día 107 de gestación. La unidad experimental era la cerda y había 12 cerdas por tratamiento.

Tabla IV-7 -. Consumo diario de vitamina E sintética (acetato de all-rac- α -tocoferol) en el pienso y natural (alfa tocoferol soluble) en el agua de bebida de las cerdas experimentales durante la lactación.

Tratamiento	Vitamina E sintética (mg/día)	Vitamina E Natural (mg/día)
T1- vit E sintetica	150	...
T2- nat -1/2	...	75
T3 nat-1/3	...	50

NB. Cálculos realizados teniendo en cuenta que cada mL de producto contiene 70 mg de Vitamina E.

^aExpresado como mg/kg pienso (estimando como media que comen 5kg al día)

^bEquivale a 1,071 mL de producto/cerda y día

^cEquivale a 0,714 mL de producto/ cerda y día

Tal y como hemos señalado en el ensayo # 2, las cerdas seleccionadas para el experimento promediaron 250 kg (\pm 8,98). A los 25 días de lactación, casi al destete pesaron 210 kg (\pm 8.85) en el momento del inicio de la gestación y se escogieron las que estaban entre el tercer y sexto parto. El destete se produjo a los 28 días de edad. El estudio comprendió desde la última semana de gestación (107 días) hasta los 28 días de lactación

La vitamina E natural añadida en el agua de bebida para madres y lechones fue una emulsión de acetato α -tocoferol hidrosoluble de 70 mg de la RRR- α -tocoferol / g (H2E-Vitapherole-E 7% de FG, VitaeCaps, SA, Talavera de la Reina, Toledo, España).

Tabla IV-8-.- Ingredientes (%) y composición calculada de los piensos administrados a las cerdas durante la gestación y lactación.

MATERIAS PRIMAS (%)	Gestación	Lactación
Cebada	36,0	36,3
Maíz	12,0	12,0
Trigo	5,0	5,0
Harina soja 44	7,8	15,0
Salvado de trigo	25,0	20,0
Pulpa de remolacha	10,0	5,0
Melazas	1,0	1,0
Manteca 1,5	1,2	2,8
Carbonato cálcico	1,01	0,99
Fosfato bicálcico	0,19	0,82
Sal	0,41	0,50
L-lisina líquida 50		0,16
Metionina líquida		0,01
Cloruro de colina	0,03	0,03
Enzimas	0,10	0,10
Corrector ¹	0,30	0,30
COMPOSICIÓN CALCULADA (%)		
Proteína bruta	14,0	16,5
Grasa bruta	3,3	5,1
Fibra bruta	6,3	5,7
Cenizas	5,4	6,0
Lisina	0,6	0,9
EN (kcal/kg)	2045	2155
COMPOSICIÓN ANALIZADA		
Vitamina E ($\mu\text{g/g}$ α -tocoferol) ²		33,31

¹Vitamina A: 9.000,00 IU; Vitamina D3: 1.750,00 IU; Vitamina E (all rac acetato de α -tocoferol): 30,00 mg; Vitamina B1: 1,0 mg; Vitamina B2: 3,50 mg; Vitamina B12: 0,02 mg; Vitamina B6: 0,50 mg; Ácido nicotínico: 30,00 mg; Biotina: 0,05 mg; Ácido pantoténico: 10,0 mg; Vitamina K3: 0,5 mg; Cloruro de colina: 200,00; Fe (Carbonato ferroso): 50,00 mg; Cu (Sulfato pentahidratado): 15,0 mg; Co (Sulfato heptahidratado): 0,45 mg; Zn (Óxido): 90,00 mg; Mn(Sulfato monohidrato): 35,00 mg; I (Ioduro potásico): 0,5 mg; Se (Selenito sódico): 0,0675 mg; 6-fitasa EC 3,1,3,26: 750,00 FTU; BHT y etoxiquin E 324: 0,1 mg.

² Los grupos que recibieron vitamina E natural en el agua de bebida se formularon con un corrector idéntico, pero carente de vitamina E (all-rac- α -tocoferol). La concentración analizada en ese pienso fue de 9,18 μg de α -tocoferol/g de pienso.

Se realizaron los siguientes controles experimentales y recolección de muestras:

Control de los parámetros reproductivos: intervalo destete-celo, intervalo destete-cubrición fértil, porcentaje de fertilidad, número de embriones implantados (estimado por ultrasonido), porcentaje de repeticiones, número de nacidos totales, vivos y muertos, porcentaje de mortalidad en lactación y número de destetados.

Control analítico de los piensos utilizados.

Toma de muestra de calostro y leche (al destete) para el análisis de contenido en tocoferol.

Toma de muestra de sangre de las cerdas a la entrada en la sala de partos (día 0 de prueba / día 107 de gestación), a los dos días post-parto, día 14 post-parto y en el momento del destete para la determinación del contenido en suero de α -tocoferol.

La diferentes muestras que se recolectaron se mantuvieron conservadas a -20°C hasta su análisis.

Lechones

La fase inicial post-destete se realizó en la misma granja comercial detallada anteriormente en el ensayo # 2. El manejo fue semejante y coincide el periodo de destetado. La duración del ensayo en esta etapa fue 14 días a partir del destete. Los lechones iniciaron la misma con un peso promedio de 7.936 kg y el peso al final del ensayo fue alrededor de 9.986 kg. La unidad experimental fue también la corralina de 6 animales y había 8 réplicas por tratamiento. Los lechones recibieron un pienso pre-estárter formulado por PigCHAMP Pro Europa, S.A cuya composición se presenta en la (*Tabla IV-9*).

Tabla IV-9 - Ingredientes (%) y composición calculada de los piensos administrados a los lechones desde el destete (28 días) a 42 días de edad.

MATERIAS PRIMAS (%)	28-42 días
Cebada	22,9
Maíz	23,5
Trigo	10,0
Soja Extr.	10,0
Harina soja 44	8,0
Harina pescado	7,6
Suero ácido	12,5
Manteca	2,6
L-Lysina	0,77
L-Treonina	0,17
DL-Metionina 99	0,22
Carbonato cálcico	0,76
Fosfato dicálcico	0,67
Sal	0,15
Corrector ¹	0,20
COMPOSICIÓN CALCULADA %	
Materia seca	90,0
Cenizas	5,5
Proteína bruta	20,0
Fibra bruta	2,8
Extracto etéreo	7,1
Calcio	0,8
Fósforo total	0,67
Fósforo disponible	0,40
Lisina	1,50
Lisina digestible	1,35
EN (kcal/kg)	2510
Vitamina E (µg/g α-tocoferol) ²	25,38

¹Vitamina A: 6.000,00 IU; Vitamina D3: 12.000,00 IU; Vitamina E (all rac acetato de α-tocoferol): 12,5 mg; Vitamina B1: 0,5 mg; Vitamina B2: 2,0 mg; Vitamina B12: 0,012 mg; Vitamina B6: 1,0 mg; Ácido nicotínico: 12,0 mg; Ácido pantoténico: 6,0 mg; Cloruro de colina: 100,0; Fe (Sulfato monohidrato + carbonato ferroso): 70,0 mg; Cu (Sulfato pentahidratado): 20,0 mg; Co (Sulfato heptahidratado): 0,42 mg; Zn (Óxido): 75,00 mg; Mn(Sulfato monohidrato+óxido): 35,0 mg; I (Ioduro potásico): 0,4 mg; Se (Selenito sódico): 0,112 mg; 6-fitasa EC 3,1,3,26: 500,0 FTU; BHT y etoxiquín E 324: 0,3 mg.

² Los grupos que recibieron vitamina E natural en el agua de bebida se formularon con un corrector idéntico, pero carente de vitamina E (all-rac-α-tocoferol). La concentración analizada en ese pienso fue de 9,75 µg de α-tocoferol/g de pienso.

En el momento del destete, los lechones de cada uno de los tres tratamientos se dividieron en grupos que recibieron programas de alimentación diferentes. En total se obtuvieron siete grupos experimentales: Tres tratamientos con lechones proveniente de cerdas no suplementadas con vitamina E natural en el agua de bebida (T1-sintético), dos tratamientos con lechones procedentes de cerdas suplementadas con 75 mg α -tocoferol de vitamina E en agua de bebida (T2; ratio 1/2 sintética: natural) y otros dos tratamientos con lechones de cerdas suplementadas con 50 mg α -tocoferol de vitamina E en agua (T3; ratio 1/3). En la *Tabla IV-10* se muestra resumidamente el diseño.

Tabla IV-10 -. Tratamientos experimentales en función de la administración de Vit E sintética o natural (Vitapherole EP 1000/50) en las fases de lactación (a sus madres) y lechones. La cantidad de vitamina E natural se incorporó a un ratio 1/2 o 1/3 respecto a la cantidad de vitamina E sintética que se aportó en cada fase.

TRATAMIENTOS	CERDAS EN LACTACIÓN	LECHONES
1	Sintética	Sintética
2	Sintética	Natural 1/2
3	Sintética	Natural 1/3
4	Natural 1/2	Sintética
5	Natural 1/2	Natural 1/2
6	Natural 1/3	Sintética
7	Natural 1/3	Natural 1/3

Por datos históricos de la granja experimental, se estimó un consumo medio diario en la fase de destete de 222 g/d. Por lo tanto, a la dosificación que se incorporó la vitamina E sintética, cada lechón consumió aproximadamente $\pm 3,33$ mg de vitamina E/día.

Tabla IV-11-. Consumo diario de vitamina E sintética (acetato de all-rac-alfa-tocoferol) en el pienso y natural (alfa tocoferol soluble) en el agua de bebida de los lechones durante el periodo de destete.

GRUPOS	Vitamina E sintética (mg/día)	Vitamina E natural (mg/día)	PRE-ESTARTER ml de producto por tratamiento (96 lechones)
Grupo sintético ^a	3.33		
Grupo 1/2 ^b	...	1.7	2.331
Grupo 1/3 ^c	...	1.1	1.508

1 mL de producto = 70 mg de vitamina E; cálculo para 16 corralinas, 96 lechones en total

a Expresado como mg/kg pienso (estimando como media que comen 0,222 kg al día)

b Equivale a 0,0242 mL de producto/lechón y día

c Equivale a 0,0157 mL de producto/ lechón y día

Se realizaron los siguientes controles generales y recolección de muestras:

Rendimientos productivos: pesaje individual de los lechones a los 2 y 28 días de vida y de pienso con el fin de valorar la ganancia de peso, consumo medio diario de alimento e índice de conversión.

Análisis de los piensos.

A los 39 días de vida, se determinó la concentración de α -tocoferol en diferentes órganos y tejidos: suero, músculo, hígado y grasa subcutánea. Además también se determinó la estabilidad oxidativa de la vitamina E en las muestras de suero e hígado.

Toma de muestra de sangre de 8 lechones por tratamiento a los 2, 14 y 28 días de vida para la determinación del contenido de α -tocoferol en suero.

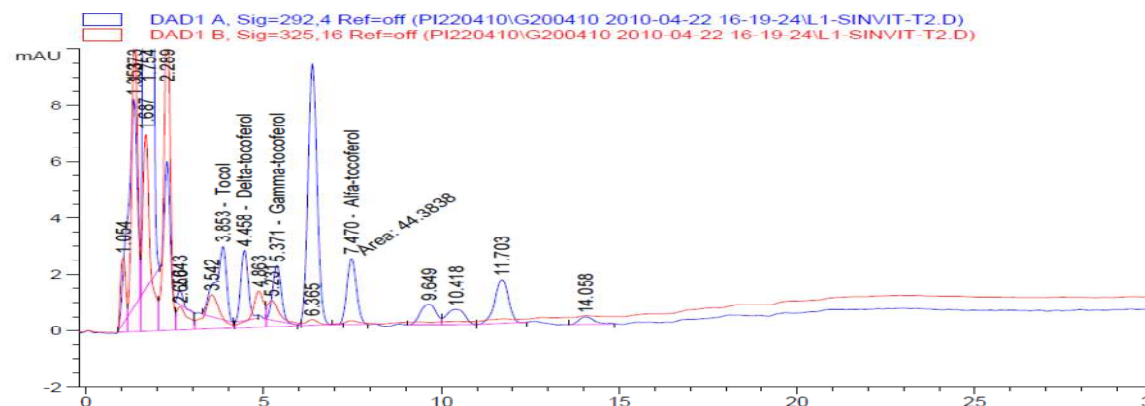
La diferentes muestras que se recolectaron se mantuvieron conservadas a -20°C hasta su análisis.

IV.2.4.- Análisis de laboratorio

IV.2.4.1.- Procedimiento de determinación del contenido en vitamina E de los piensos experimentales.

La determinación del contenido en vitamina E, en forma de α -tocoferol, se realizó siguiendo una modificación del método descrito por Rey et al. (2006). Brevemente, el mismo día del análisis se molieron aproximadamente 100 g del pienso compuesto. Posteriormente, se pesaron 0.2 g de muestra en un tubo topacio y se añadió 1 ml de KCl al 1.15 %, 2 ml de pirogalol (solución al 3 % en etanol) y 0.3 ml de KOH al 50 %. A continuación, se procedió a la incubación de las muestras a 70 °C en agitación durante 2 horas. Las muestras se dejaron enfriar y la vitamina E se extrajo con éter de petróleo tras agitación y centrifugación durante 10 minutos a 3000 rpm. A continuación se recogió la fase superior de éter de petróleo y éste se evaporó bajo corriente de nitrógeno. Posteriormente se diluyó la muestra en 200 μ l de etanol absoluto y procedió al análisis cromatográfico por HPLC. La fase móvil fue metanol: agua (97:3) (v/v) a un flujo de 2.0 ml/min.

La identificación de la forma α -tocoferol de vitamina E se determinó por comparación de los tiempos de retención de los patrones y de las muestras. La cuantificación se realizó a partir de una cantidad conocida del patrón y se expresó en forma de μ g/g de alimento.

Ilustración IV-1 - Cromatograma del análisis de alfa-tocoferol en pienso**IV.2.4.2.- Análisis químico de los tejidos animales.****IV.2.4.2.1.- Métodos analíticos del tejido adiposo subcutáneo****IV.2.4.2.1.1.- Procedimiento de determinación del contenido de α -tocoferol en grasa.**

La determinación de α -tocoferol se realizó siguiendo una modificación del método descrito por Rey et al. (2006).

Una vez descongelado el tejido a analizar, se pesaron aproximadamente, 0.05 g de muestra en un tubo topacio. Se añadieron 100 μ l de KCl al 1.15 %, 2 ml de pirogalol (solución al 3 % en etanol) y 0.3 ml de KOH al 50 %. Se mezcló bien y se procedió a la incubación de las muestras a 70 °C en agitación durante 30 minutos. A continuación se dejaron enfriar las muestras y la vitamina E se extrajo con éter de petróleo tras agitación en vortex y centrifugación durante 10 minutos a 3000 rpm. El éter de petróleo se evaporó bajo corriente de nitrógeno y finalmente la muestra se diluyó en 200 μ l de etanol absoluto procediendo al análisis por HPLC.

Para el análisis cromatográfico la muestra se inyectó en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) Agilent Technologies, Serie 1100, (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), equipado con una bomba cuaternaria y una columna Lichrcart PR 18 (250 mm x 4mm y 5µm de tamaño de partícula). La fase móvil empleada fue metanol: agua (97:3) a un flujo de 2,0 ml/min.

La detección de α -tocoferol se realizó mediante un detector ultravioleta fijado a 292 nm. La identificación se realizó por comparación de los tiempos de retención con el correspondiente patrón. La cuantificación se realizó a partir de una cantidad conocida de patrón externo y se expresó en forma de µg/g de muestra.

IV.2.4.2.2.2.- Procedimiento de determinación del perfil de ácidos grasos de la grasa subcutánea

Procedimiento de extracción de la grasa mediante el método de fusión térmica (Carrapiso y García, 2000). Se procedió a separar la piel de la muestra y se colocó la grasa en un tubo de vidrio que se introdujo en un horno microondas durante 1 minuto aproximadamente, a una potencia de media de (350 w), hasta que la grasa estuviera bien fundida. Posteriormente se colocaron 50 mg = 70 µl de la grasa fundida en otros tubos de ensayo, se añadió 1 ml de metilato sódico al 5 % y se colocaron los tubos en la estufa a 80°C agitándose en vortex cada 15 minutos. Pasada una hora, se sacaron los tubos de la estufa y se añadió 1 ml de sulfúrico en metanol al 5 %. Nuevamente se taparon los tubos y se introdujeron en la estufa a 80° C una hora más agitándolo en vortex cada 20 minutos. Después de pasada la hora se sacaron y se dejaron enfriar a temperatura ambiente, añadiendo 1 ml de éter de petróleo y agitándolo vigorosamente. Se recogió la capa superior y se colocó en un vial de 2 ml para analizar en el cromatógrafo de gases.

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se separaron mediante un cromatógrafo Agilent Technologies 6892 equipado con un inyector de split (1/50), un detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar Innowax con fase estacionaria polietilen-glicol (30 m x 0.32 mm x 0.25 µm) (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Las condiciones

utilizadas fueron las siguientes: Programa de temperaturas: temperatura inicial de 170 °C y temperatura final de 250 °C con un incremento de 4°C/min durante 18 minutos. El inyector y el detector se mantuvieron a 250 °C hasta 37 min. Se utilizó nitrógeno como gas portador a un flujo de 2.5 ml/min. La identificación individualizada de los ácidos grasos se realizó mediante el empleo de mezclas conocidas de patrones externos. El ácido C15:0 (ácido-pentadecanoico) (Sigma, St Louis, M.O. USA) se utilizó como patrón interno. Los ácidos grasos se expresaron como porcentaje sobre el total de los ácidos grasos.

IV.2.4.2.2.- Métodos analíticos del tejido muscular.

IV.2.4.2.2.1.- Procedimiento de determinación del contenido de α -tocoferol en músculo.

La determinación del contenido en vitamina E del tejido muscular de cerdos ibéricos se realizó según el método descrito por Mallarino (1992).

Se pesaron 0,8 g de tejido muscular con una precisión de 0.001 y se introdujeron en un tubo de ensayo topacio al que se añadieron 3 ml de tampón de fosfato de sodio y EDTA en solución acuosa. Se homogeneizó y se repitió el paso anterior hasta alcanzar un volumen final de 10 ml. Del homogeneizado se tomaron 2 ml que se mezclaron con un volumen de 3 ml de etanol. A continuación, se añadió éter de petróleo al tubo de la mezcla que se agitó y centrifugó durante 10 minutos a 3000 rpm, recogiendo la capa superior. Tras extraer todo el éter de petróleo, se procedió a evaporar bajo corriente de nitrógeno. Posteriormente se diluyó la muestra en 200 μ l de etanol absoluto y se procedió al análisis por HPLC.

El análisis cromatográfico se realizó por HPLC utilizando una longitud de onda de 292 nm. La fase móvil fue metanol: agua (97:3) (v/v) a un flujo de 2.0 ml/min.

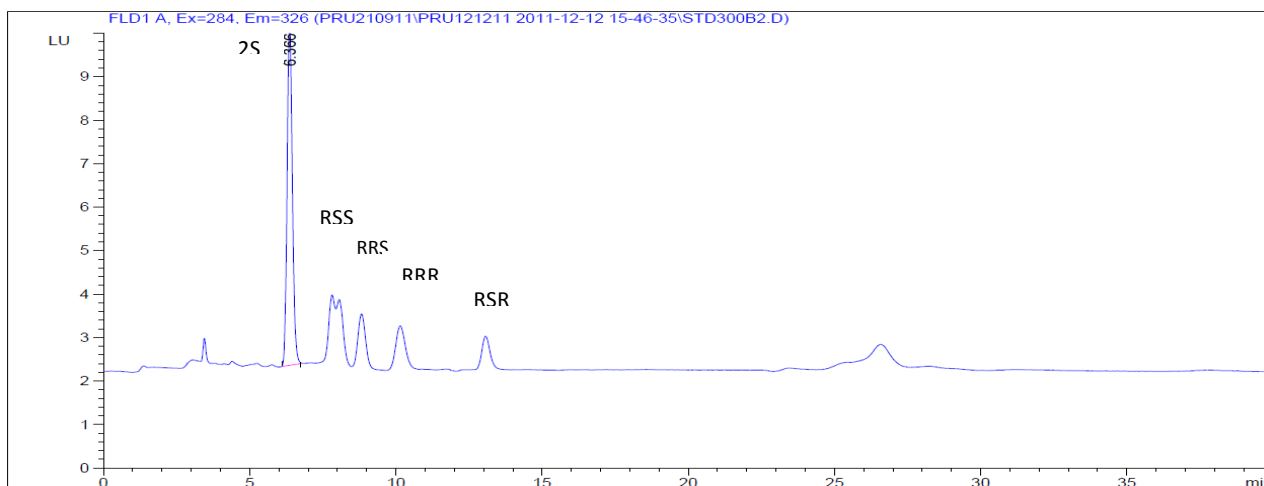
La identificación de α -tocoferol se realizó por comparación del tiempo de retención de los patrones con el tiempo de retención de las muestras en las mismas condiciones.

La cuantificación del contenido en vitamina E, en forma de α -tocoferol de las muestras se realizó considerando la recuperación de la misma a partir de una cantidad conocida de este compuesto que se añadió en la muestras con estándar externo. Los resultados se expresaron en μ g/ g de músculo.

IV.2.4.2.2.2. Determinación de los estereoisómeros del α -tocoferol en el músculo.

Para la determinación de los estereoisómeros de α -tocoferol se realizó una derivatización de un aislado de α -tocoferol obtenido en un colector de fracciones tras separación por HPLC según el procedimiento descrito en el apartado IV.2.4.2.2.1 de acuerdo con la metodología descrito por Drotleff and Ternes (2001). El remanente de la fracción de α -tocoferol extraída con hexano se sometió a evaporación bajo corriente de nitrógeno. Una vez evaporado se procedió a su derivatización diluyendo el residuo contenido en el tubo de ensayo con 50 μ l de dimetil-éter, se homogeneizó y se añadieron 25 μ l de hidróxido de potasio 1:1 (v: v). A continuación se añadieron 45 μ l de dimetil sulfato y la muestra se sometió a agitación durante una hora. Al cabo de la hora, se evaporaron en corriente de nitrógeno. El residuo se diluyó con 100 μ l de agua milli-Q y se agitó enérgicamente. A continuación se añadieron 1.5 ml de hexano y se centrifugó durante 10 minutos a 3000 rpm, recogiendo la capa superior para la cuantificación de los diferentes estereoisómeros.

Para el análisis cromatográfico se inyectaron 100 μ l de muestra en un cromatógrafo de líquido de alta resolución (HPLC) Agilent, Serie 1050, equipado con una bomba isocrática y una columna Chiral-ce OD-H (250 mmx 4.6 mm 5 μ m de tamaño de partículas) con su pre-columna correspondiente. La detección de los estereoisómeros se realizó mediante un detector de fluorescencia (Agilent Technologies, serie: 1200). La fase móvil fue hexano (100%) a un flujo de 1.0 ml/min.

Ilustración IV-2.- Cromatograma de análisis de estereoisómeros**IV.2.4.2.2.3.- Procedimiento de determinación del perfil de ácidos grasos tejido muscular**

Se siguió el método propuesto por Sukhija y Palmquist (1988) y Meier et al. (2006) con ligeras modificaciones. Para ello se pesaron 0.2 g de muestra molida previamente liofilizada y se colocaron en un tubo con tapón de rosca. Se utilizó ácido Pentadecanóico (C15:0) disuelto en tolueno (10 mg/ml) como patrón interno, añadiéndose a cada muestra 1 ml de la solución. A continuación se añadieron 3 ml de una mezcla (al 10%) de cloruro acético en metanol, y 1 ml de tolueno. Se agitaron durante 30 segundos y se colocaron en un baño a 70 °C, durante dos horas. Tras enfriar las muestras a temperatura ambiente se añadieron 5 ml de carbonato potásico al 6% y 1 ml de tolueno. Seguidamente, se volvieron a agitar las muestras durante 2 minutos y se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos. La capa superior con los ésteres metílicos de los ácidos grasos se transfirió a otro tubo al cual se añadió 1 g. de sulfato sódico anhidro. Se agitó fuertemente y se dejó reposar una hora. La parte superior se recogió en un vial de 4 ml y se analizó el contenido de ácidos grasos por cromatografía en fase gaseosa. Los ácidos grasos se expresaron en porcentaje (%).

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se separaron mediante un cromatógrafo Agilent Technologies 6892 equipado con un inyector de split (1/50), un detector de ionización de

llama (FID) y una columna capilar Innowax con fase estacionaria polietilen-glicol en condiciones semejantes a las descritas en el apartado IV.2.4.2.2.-

IV.2.4.2.3.- Métodos analíticos del tejido hepático

IV.2.4.2.3.1.- Procedimiento de determinación del contenido de α -tocoferol en el hígado.

La determinación de vitamina E del hígado se realizó tal y como se ha descrito anteriormente en el método descrito por Mallarino (1992).

IV.2.4.2.3.2.- Procedimiento de determinación del grado de oxidación de homogeneizados de tejido hepático por inducción.

La inducción a la oxidación de homogeneizados de tejido hepático se realizó por una modificación del método de Kornbrust y Mavis (1980). Brevemente se prepararon Tris-maleico 80 mM a pH 7.4, TBA-TCA-ClH (1.875 g de TBA, 75 g de TCA y 250 ml de ClH 0.5 N), sulfato ferroso 5mM y ácido ascórbico 2 mM. Se pesaron 3 g de muestra a los que se añadieron 27 ml de KCl 1.15% y se homogeneizaron durante 35-40 s. Se tomó 1 ml del homogeneizado que se introdujo en un tubo de ensayo que contenía una mezcla de 5 ml de Tris-maleico, 2 ml de ácido ascórbico y 2 ml de sulfato ferroso preparado previamente. Rápidamente, y antes de introducir los tubos con la mezcla en un baño a 37°C, se tomaron de los mismos 0.4 ml que se mezclaron con 0.8 ml de TBA-TCA-HCl. Se realizaron muestreos sucesivos durante los 30, 60, 90, 120 y 180 minutos. A continuación, la mezcla de la muestra con el reactivo de TBA se calentó en agua hirviendo durante 30 minutos. Los tubos se centrifugaron durante 10 minutos y la lectura se realizó a 532nm.

IV.2.4.2.4.- Método analíticos de las secreciones y líquidos corporales.

IV.2.4.2.4.1.- Procedimiento de determinación del contenido de α -tocoferol en calostro y leche.

La determinación de vitamina E en calostro y leche se realizó modificando ligeramente el método anteriormente descrito para la grasa. La cantidad de muestra de partida en este caso fueron 100 μ l de muestra.

IV.2.4.2.4.2.- Procedimiento de determinación del perfil de ácidos grasos en calostro y leche.

La determinación del perfil de ácidos grasos del calostro y de la leche se realizó tal y como se ha descrito anteriormente en el método descrito por Sukhija y Palmquist (1988). Las muestras han sido previamente liofilizadas.

IV.2.4.2.4.3.- Procedimiento de determinación del contenido de α -tocoferol en suero.

Se pipetearon 100 μ l de suero descongelado con una precisión de 0.001 y se introdujeron en un tubo de ensayo topacio al que se añadieron 1 ml de etanol y 100 μ l de agua destilada. Se agitaron en el vortex 1 minuto. A continuación se añadieron 1 ml de éter de petróleo al contenido del tubo y se centrifugó durante 10 minutos a 3000 rpm, recogándose la capa superior. Tras extraer todo el éter de petróleo, se procedió a evaporar bajo corriente de nitrógeno. Posteriormente se diluyó la muestra en 100 μ l de etanol absoluto y procediendo al análisis por HPLC.

El análisis cromatográfico se realizó inmediatamente por HPLC utilizando una longitud de onda de 292 nm. La fase móvil fue metanol: agua (97:3) (v/v) a un flujo de 2.0 ml/min.

La identificación de la forma α -tocoferol de vitamina E se determinó por comparación de los tiempos de retención de los patrones y de las muestras. La cuantificación se realizó a partir de una cantidad conocida de patrón externo y se expresó en forma de μ g/ml de suero.

IV.2.4.2.4.4.- Evaluación de las actividades antioxidante del suero de los lechones

IV.2.4.2.5.- Método de determinación del grado de oxidación del suero por inducción.

La inducción a la oxidación del suero se realizó por una modificación del método de Kornbrust y Mavis (1980), descrito en el apartado dedicado al análisis del hígado.

Se prepararon Tris-maleico 80 mM a pH 7.4, TBA-TCA-ClH (1.875 g de TBA, 75 g de TCA y 250 ml de ClH 0.5 N), sulfato ferroso 5mM y ácido ascórbico 2 mM. Se introdujo 200 μ l de en tubos de ensayos que ya contenía 1.5 ml de ácido perclórico a 3.86 % 100 μ l de ácido ascórbico y 100 μ l de sulfato ferroso preparado previamente y se homogeneizaron durante 10-15 s. Rápidamente, y antes de introducir los tubos con la mezcla en un baño a 37°C, se tomaron de los mismos 0.4 ml que se mezclaron con 0.8 ml de TBA-TCA-HCl para paralizar la reacción de oxidación. Se dejaron los eppendorfs en frigorífico a 4° C durante media hora antes de colocarlos a baños a 100°C. Se realizaron muestreos sucesivos durante los 15 y 30 minutos siguientes. A continuación, las muestras se calentaron en agua hirviendo (100°C) durante 30 minutos. Los eppendorfs se centrifugaron durante 10 minutos y la lectura se realizó a 532nm.

IV.2.4.2.5.1- Procedimiento de determinación de la capacidad de reducción férrica del suero (FRAP)

La determinación de la capacidad de reducción férrica del suero (FRAP) se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Benzie y Strain (1999). El reactivo FRAP fue preparado fresco mezclando 10 volúmenes de tampón de acetato (300 mM) con un volumen de 10 mmol solución TPZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina en 40 mM HCl) y un volumen de 20 mM de cloruro férrico acuoso. A continuación mezclaron 10 μ l del extracto de la muestra con 0,3 ml de la solución de trabajo FRAP. La absorbancia de las muestras a 593 nm se registró después de 0 y 4 minutos. Los resultados se expresaron en μ M.

IV.2.4.2.5.2- Procedimiento de determinación de la concentración de glutatión

El glutatión total (GSHt), el reducido (GSH) y el oxidado (GSSH) se cuantificaron por espectrofotometría a 405 nm en muestras de suero desproteínizado utilizando el correspondiente kit de diagnóstico colorimétrico (Arbor assays, USA). La concentración de glutatión oxidado se determinó a partir de las muestras tratadas con 2-vinilpiridina leído con una curva estándar tratada con 2-vinilpiridina. El glutatión libre o reducido (GSH) se obtuvo por diferencia de las concentraciones de la forma oxidada (GSSH) obtenidos de los estándares y muestras tratados con la 2-vinilpiridina de la forma total o no tratados con el anterior reactivo (GSH total). Las concentraciones obtenidas se expresaron como μM de glutatión.

IV.2.4.2.4.4.- Procedimiento de determinación de la concentración de inmunoglobulinas en el suero de lechones.

La concentración de inmunoglobulinas (IgA, IgG, e IgM) en el suero de lechones se cuantificó utilizando un kit ELISA (Bethyl Laboratories, Inc., USA.). Se preparó previamente una solución stock con un factor de dilución 1:100 diluyendo una parte de la muestra de suero en noventa y nueve partes de un tampón diluyente (0.05M Tris, 0.15 NaCl, 1% BSA, 0.05% Tween 20). Partiendo de esta dilución, para el análisis de IgA, la dilución se llevó a 1:10000. El anticuerpo purificado (Goat x-Pig IgA) se diluyó en tampón de revestimiento (0,05 M de carbonato-bicarbonato a pH 9,6) y se incubó durante 60 minutos en una placa de 96 pocillos. Posteriormente, la placa se lavó tres veces con solución de lavado a pH 8,0 (0.05M Tris, 0.15 NaCl, 0.05% Tween 20) para eliminar los anticuerpos no recubiertos. Se añadieron 200 μl de una solución de bloqueo (0.05M Tris, 0.15 NaCl, 1% BSA, pH 8,0) a cada pocillo y se incubó la placa a temperatura ambiente durante toda la noche. Al día siguiente se eliminó la solución de bloqueo y se lavó la placa tres veces. Posteriormente se añadieron las muestras y las concentraciones conocidas de la curva estándar y se incubó la placa durante 1 hora. A continuación se lavó la placa como mencionamos anteriormente. Para la detección de anticuerpos se diluyó la HRP purificada (Goat x-Pig IgA HRP) a una concentración de 1:75000 y se añadieron 100 μl en cada pocillo incubando durante una hora. Tras finalizar el tiempo se eliminó el reactivo.

Finalmente, la solución de sustrato TMB se añadió y se incubó durante 15 min. Después de la incubación con el sustrato, la reacción se interrumpió con una solución de ácido sulfúrico 1 M de (H₂SO₄) y se midió la absorbancia a 450 nm. Protocolos similares se utilizaron para la cuantificación de IgM e IgG con distintas diluciones. Se preparó una curva estándar para cada grupo de análisis por ELISA, y los valores finales fueron expresados en mg / ml.

IV.2.5.- Tratamiento estadístico.

La unidad experimental para el análisis de los datos fue la cerda, el corral (para los datos productivos de los lechones) o el lechón individual para los datos analíticos (tomando en cada caso un lechón por corral como muestra representativa del mismo). Los datos se analizaron siguiendo un diseño completamente al azar, utilizando el modelo lineal general (GLM) contenidas en la versión 9.2 de SAS (Statistical Analysis Institute, 1999). Los efectos principales y sus interacciones se estudiaron mediante contrastes ortogonales. Para estudiar el efecto del tiempo, tratamiento y la interacción entre ambos, se realizó un análisis por medidas repetidas. Para comparación individual de medias se realizó un test Duncan.

V. RESULTADOS

V. RESULTADOS

V.1.- Ensayo 1

V.1.1.- Acumulación de alfa-tocoferol

Las concentraciones de tocoferol en suero y leche de cerdas suplementadas con α -tocoferol natural en el agua de bebida frente a los sintéticos alimentadas con el acetato de α -tocoferol en el pienso (control) se presentan en la *Tabla V-1*.

Tabla V-1 - Concentraciones de alfa-tocoferol del suero y de la leche ($\mu\text{g/g}$) de cerdas que consumieron alfa-tocoferol en el agua de bebida (suplementadas) versus control.

	M-Ctrol	M-Sup
Suero		
(-7) días pre-parto	1,7352	1,6117
5 días post-parto	1,3421 ^b	2,2040 ^a
20 días post-parto	1,9372 ^b	2,4769 ^a
RMSE ¹		0,032
RMSE ²		0,041
Efecto tratamiento		0,0001
Efecto tiempo		0,0001
Tratamiento x Tiempo		0,0005
Leche		
α -tocoferol (20 días post-parto)	2,9268	3,268
RMSE ³		0,9399

M-Ctrol: grupos de madres control que solo recibieron la forma sintética en el pienso M-Sup: madres suplementadas adicionalmente con alfa-tocoferol natural en el agua de bebida.

¹RMSE: Desviación estándar de los efectos principales y las interacciones

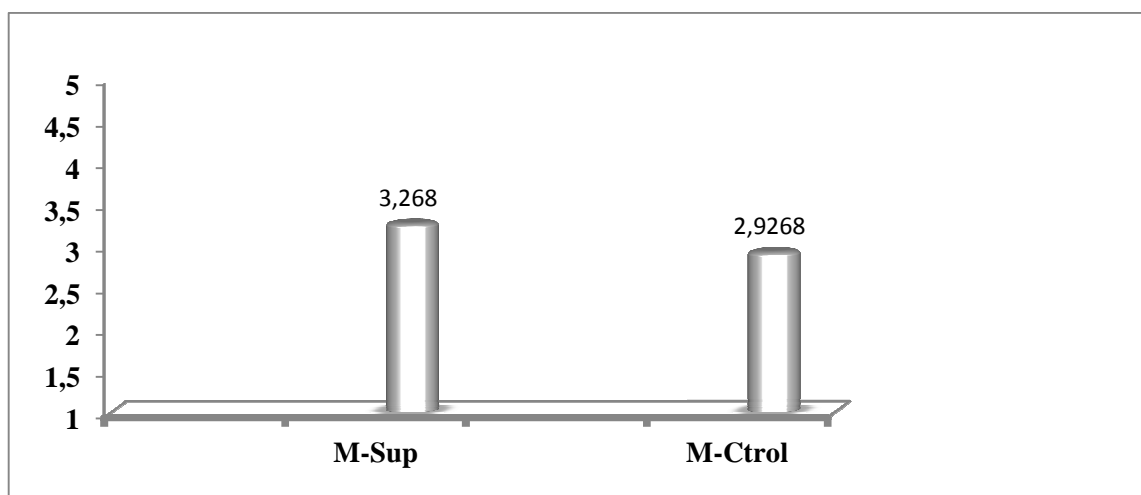
²RMSE: Desviación estándar del tiempo y las interacciones

³RMSE: Desviación estándar de la concentración de tocoferol en leche

Para un mismo tiempo, medias con superíndices diferentes difieren significativamente $P < 0.05$.

La *Ilustración V-1*, presenta la concentración de tocoferol en la leche de las madres que consumieron la forma sintética de la vitamina E en el pienso frente a las que recibieron además una suplementación con la forma natural en el agua de bebida.

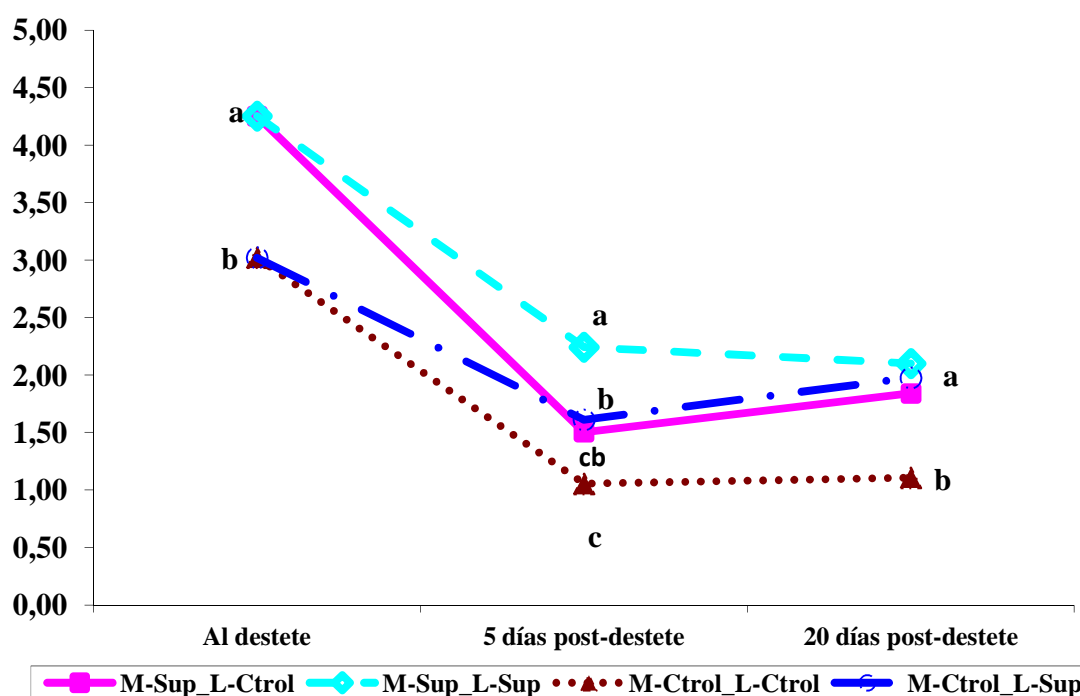
Ilustración V-1 - Concentración de alfa-tocoferol en la leche de las madres



M-Sup: grupo de cerdas suplementadas con alfa-tocoferol natural en el agua de bebida. M-Ctrol: grupo de cerdas control que solo recibieron la forma sintética en el pienso.

La concentración de tocoferol en suero de lechones de este experimento se presenta en la Ilustración V-2. Es interesante destacar que en el destete la concentración de α -tocoferol del suero fue mayor ($P = 0,0001$) en los lechones de las cerdas suplementadas con vitamina E natural en el agua de bebida en comparación con aquellos que recibieron el pienso control con la forma sintética.

Ilustración V-2 - Concentración de alfa-tocoferol del suero ($\mu\text{g/g}$) de lechones a lo largo del experimento.



M-Ctrol_L-Ctrol: Lechones provenientes de cerdas sin suplementar, que tampoco fueron suplementados tras el destete, M-Ctrol_L-Sup: Lechones provenientes de cerdas sin suplementar, que si fueron suplementados tras el destete; M-Sup_L-Ctrol: Lechones provenientes de cerdas suplementadas, que no fueron suplementados tras el destete; M-Sup_L-Sup: Lechones provenientes de cerdas suplementadas, que si fueron suplementados tras el destete.

RMSE: (Desviación estándar de los efectos principales y las interacciones)= 0.179

RMSE: (Desviación estándar combinada del tiempo y las interacciones)= 0.147

Efecto tratamiento= 0.0001; Efecto tiempo= 0.0001; Tiempo x tratamiento = 0.0276

Para un mismo tiempo, medias con superíndices diferentes difieren significativamente ($P < 0.05$).

V.1.2.- Estatus oxidativo de los lechones

El poder antioxidante reductor del hierro sérico (FRAP) de los lechones de los diferentes grupos experimentales se muestra en la **Tabla V-2** y la concentración de glutatión en forma oxidada y reducida en la **Tabla V-3**.

Tabla V-2 - FRAP del suero (capacidad reductora del hierro sérico) de los lechones que consumieron la dieta experimental¹

Vit E del lechón ¹	FRAP (μM)			
	M-Ctrol_L-Ctrol	M-Ctrol_L-Sup	M-Sup_L-Ctrol	M-Sup_L-Sup
Al destete	2,241	2,241	2,162	2,162
5 días post-destete	2,354	2,083	2,394	2,244
20 días post-destete	2,081 ^b	2,394 ^{ba}	2,518 ^a	2,703 ^a
RMSE ²	0,349			
RMSE ³	0,414			
Efecto tratamiento	0,037			
Efecto tiempo	0,0251			
Tiempo x tratamiento	0,0201			

¹M-Ctrol_L-Ctrol: Lechones provenientes de cerdas sin suplementar, que tampoco fueron suplementados tras el destete; M-Ctrol_L-Sup: Lechones provenientes de cerdas sin suplementar, que si fueron suplementados tras el destete; M-Sup_L-Ctrol: Lechones provenientes de cerdas suplementadas, que no fueron suplementados tras el destete; M-Sup_L-Sup: Lechones provenientes de cerdas suplementadas, que si fueron suplementados tras el destete.

²RMSE: Desviación estándar de los efectos principales y las interacciones

³RMSE: Desviación estándar del tiempo y las interacciones

Para un mismo tiempo, medias con superíndices diferentes difieren significativamente ($P < 0.05$)

V.1.3.- Respuesta inmune de lechones

La respuesta inmune de los lechones (las concentraciones de inmunoglobulinas IgM, IgA e IgG) en el suero de los lechones se muestra en la **Tabla V-4**. No se han observado diferencias significativas atribuidas a la suplementación con vitamina E natural en el agua de bebida. La concentración de IgM se vio modificada con el tiempo y también se observó una interacción del tiempo y el tratamiento.

Tabla V-3 - Concentración de la forma oxidada (GSSH) y reducida de glutatión (GSH) en suero de lechones.

	GSSH (μ M)				GSH-Libre (μ M)			
	M-Ctrol_ L-Ctrol	M-Ctrol_ L-Sup	M-Sup_ L-Ctrol	M-Sup_ L-Sup	M-Ctrol_ L-Ctrol	M-Ctrol_ L-Sup	M-Sup_ L-Ctrol	M-Sup_ L-Sup
Vit E del lechón ¹								
Destete	5,524	5,524	5,181	5,181	7,213	7,213	6,008	6,008
Día 5 post-destete	7,946 ^a	7,383 ^a	7,346 ^a	6,053 ^b	3,182 ^b	7,105 ^a	5,841 ^a	5,575 ^a
Día 20 post-destete	7,916 ^a	6,914 ^{ba}	6,519 ^b	5,169 ^c	3,812 ^b	7,364 ^a	4,450 ^{ba}	7,241 ^a
RMSE ²	0,763				2,199			
RMSE ³	0,718				2,327			
Efecto tratamiento	0,0019				0,0057			
Efecto tiempo	0,0001				0,1336			
Tratamiento x Tiempo	0,33318				0,0628			

¹ M-Ctrol_L-Ctrol: Lechones provenientes de cerdas sin suplementar, que tampoco fueron suplementados tras el destete; M-Ctrol_L-Sup: Lechones provenientes de cerdas sin suplementar, que si fueron suplementados tras el destete; M-Sup_L-Ctrol: Lechones provenientes de cerdas suplementadas, que no fueron suplementados tras el destete; M-Sup_L-Sup: Lechones provenientes de cerdas suplementadas, que si fueron suplementados tras el destete.

²RMSE: Desviación estándar de los efectos principales y las interacciones

³RMSE: Desviación estándar del tiempo y las interacciones

Para un mismo tiempo, medias con superíndices diferentes difieren significativamente ($P < 0.05$)

Tabla V-4 - Inmunoglobulinas (mg/ml) del suero de lechones en función del aporte de vitamina E.

	IgM				IgA				IgG			
	M-Ctrol_ L-Ctrol	M-Ctrol_ L-Sup	M-Sup_ L-Ctrol	M-Sup_ L-Sup	M-Ctrol_ L-Ctrol	M-Ctrol_ L-Sup	M-Sup_ L-Ctrol	M-Sup_ L-Sup	M-Ctrol_ L-Ctrol	M-Ctrol_ L-Sup	M-Sup_ L-Ctrol	M-Sup_ L-Sup
Vit E del lechón ¹												
Destete	0,88	0,88	0,78	0,78	0,14	0,14	0,14	0,14	34,83	34,83	30,76	30,76
Día 5 post-destete	0,68	0,70	0,72	0,74	0,15	0,16	0,13	0,13	34,02	26,03	34,18	34,30
Día 20 post-destete	0,76 ^b	0,67 ^b	1,00 ^a	0,70 ^b	0,16 ^a	0,13 ^b	0,16 ^a	0,11 ^b	37,56	33,10	30,98	28,42
RMSE ²	0,001				0,0004				20,593			
RMSE ³	0,008				0,001				19,622			
Efecto tratamiento	0,0982				0,2597				0,4279			
Efecto tiempo	0,0042				0,9111				0,9630			
Tratamiento x Tiempo	0,0015				0,2161				0,4298			

¹ M-Ctrol_L-Ctrol: Lechones provenientes de cerdas sin suplementar, que tampoco fueron suplementados tras el destete; M-Ctrol_L-Sup: Lechones provenientes de cerdas sin suplementar, que si fueron suplementados tras el destete; M-Sup_L-Ctrol: Lechones provenientes de cerdas suplementadas, que no fueron suplementados tras el destete; M-Sup_L-Sup: Lechones provenientes de cerdas suplementadas, que si fueron suplementados tras el destete.

²RMSE: Desviación estándar de los efectos principales y las interacciones

³RMSE: Desviación estándar del tiempo y las interacciones

Para un mismo tiempo, medias con superíndices diferentes difieren significativamente ($P < 0.05$)

V.2.- Ensayo 2

V.2.1.- Rendimientos productivos de los lechones

Los parámetros productivos: Peso vivo (PV), ganancia media diaria (GMD), consumo medio diario (CMD) e índice de transformación (IT) de los lechones en función de la suplementación de vitamina E de las madres se presentan en la **Tabla V-5**. Se ha podido observar, tanto en el momento del destete (28 días) como al final del experimento (a los 42 días de edad) que los lechones que reciben vitamina E sintética presentaron mayor peso vivo que los lechones del grupo natural 1/3, mientras que los del grupo natural 1/1 muestran un valor intermedio. No obstante, estas diferencias observadas no llegaron a ser significativas ($P > 0,05$). No se ha observado tampoco diferencias significativas en la ganancia media diaria.

El consumo de pienso (CMD) y el índice de transformación (IT) no fueron diferentes entre tratamientos, aunque en la primera semana después del destete, los lechones del grupo natural 1/3 numéricamente fueron los que más consumieron (162 g/d), pero sin diferencias significativas ($P > 0,05$) con los otros grupos.

V.2.2.- Acumulación de alfa-tocoferol en diferentes tejidos

Las concentraciones de α -tocoferol en suero (madres y lechones), calostro y leche en función del aporte de vitamina E se presenta en la **Tabla V-6**. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($P > 0,05$) en caso del suero cerdas y el calostro.

En el caso del suero de lechones y en la leche se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,05$). Así mismo se encontraron diferencias significativas a lo largo del tiempo de administración ($P < 0,001$). En caso del suero de lechones, se observó interacción entre tiempo y tratamiento ($P < 0,001$).

V.2.3.- Perfil de ácidos grasos en tejidos en secreciones

El perfil de ácidos grasos del calostro y de la leche (a los 7 y 27 días respectivamente) en función del aporte de vitamina E a las cerdas se presenta en las *Tabla V-7*, *Tabla V-8* y *Tabla V-9*. El calostro de las cerdas que habían sido suplementadas con vitamina E sintética presentaron una concentración de ácidos grasos saturados superior que las que recibieron la forma natural ($P=0.0257$). La leche a los 7 y 27 días de lactación se vio afectada en menor medida de forma que tan solo se observaron niveles superiores de C18:1 n-7 en el grupo que recibió 1/3 de vitamina E natural respecto al que recibió 1/1 (7 días de lactación) o respecto a la forma sintética (27 días). La leche de cerdas suplementadas con 1/3 también presentaron mayor índice de insaturación ($P=0.021$) y las que recibieron 1/1 de la vitamina E natural tuvieron menor concentración de C18:2 que las que se suplementaron con la vitamina E sintética en pienso.

V.2.4.- Estatus oxidativos de los lechones

La capacidad antioxidante reductora del hierro (FRAP) y la concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) del suero de los lechones de los diferentes grupos experimentales se muestra en la *Tabla V-10*. No se han observado diferencias significativas en el caso del FRAP del suero de lechones. La concentración de TBARS ($P> 0,05$) sí se vio afectada. Los lechones procedentes de madres que habían sido suplementadas con la forma sintética de vitamina E en pienso presentaron mayor concentración de TBARS que los procedentes de madres que habían sido suplementadas con la forma natural. Además en ambas determinaciones (FRAP y TBARS) se observó un efecto tiempo ($P< 0,05$) y ($P< 0,001$) respectivamente. No hubo interacción entre tiempo y tratamiento.

V.2.5.- Respuesta inmune de los lechones

La respuesta inmune (concentraciones de inmunoglobulinas IgM, IgA e IgG) en suero de los lechones en función de los diferentes tratamientos experimentales se presentan en la **Tabla V-11**. Se observaron diferencias significativas ($P=0.0446$) en la concentración de IgA como consecuencia de la dosis de suplementación de vitamina E natural. Los lechones suplementados con la dosis de 1/3 de vitamina E natural tuvieron niveles más bajos que los que se suplementaron con 1/1. La concentración de inmunoglobulinas se modificó con el tiempo y no hubo interacciones tiempo*tratamiento.

Tabla V-5 - Parámetros zootécnicos de los lechones entre los 28-42 días en función del aporte de vitamina E a la cerda

Vitamina E cerda	30 ppm SINT	NAT 1/1	NAT 1/3	SEM ¹	Pr>F	CONTRASTES			
						SINT vs NAT	SINT vs NAT 1/3	SINT vs NAT 1/1	NAT 1/3 vs NAT 1/1
Peso vivo a 28 días	6,95	6,77	6,29	0,411	0,2543	0,2406	0,1115	0,6647	0,2414
Peso vivo 35 días	7,56	7,44	6,90	0,430	0,2712	0,2963	0,1301	0,7743	0,2166
Peso vivo a 42 días	9,11	8,94	8,36	0,441	0,2150	0,2328	0,0955	0,6968	0,1965
GMD1	0,10	0,11	0,11	0,014	0,7200	0,4221	0,4643	0,5122	0,9300
GMD2	0,22	0,22	0,21	0,014	0,6701	0,4254	0,3744	0,6223	0,6903
GMDtotal	0,17	0,17	0,16	0,009	0,6852	0,6991	0,4705	0,9572	0,4385
CMD1	0,14	0,15	0,16	0,016	0,2587	0,1676	0,1024	0,4501	0,3700
CMD2	0,32	0,31	0,32	0,016	0,7283	0,6045	0,8822	0,4546	0,5480
CMDtotal	0,24	0,23	0,25	0,014	0,6306	0,6766	0,4290	0,9438	0,3894
IT1	1,38	1,47	1,78	0,212	0,2014	0,2126	0,0878	0,6768	0,1792
IT2	1,50	1,47	1,56	0,119	0,7305	0,8368	0,5761	0,8389	0,4467
ITT	1,42	1,42	1,61	0,110	0,1518	0,3348	0,0945	0,9848	0,0910

¹SEM: n= 8

Tabla V-6 - Concentración de alfa-tocoferol ($\mu\text{g/ml}$) del suero, calostro y leche de las cerdas y del suero del lechón en función del aporte de vitamina E a la cerda.

Vitamina E cerda	30 ppm SINT	NAT 1/1	NAT 1/3	RMSE ¹	RMSE ²	Pr> F trat	Pr> F tiempo	Tiempo * trat	CONTRASTES			
									SINT vs NAT	SINT vs NAT 1/3	SINT vs NAT 1/1	NAT 1/3 vs NAT 1/1
α -Tocoferol suero cerda ($\mu\text{g/ml}$)												
Día 30 gestación	0,343	0,404	0,350	0,776	0,647	0,3665	0,0007	0,9438	0,2747	0,1705	0,6124	0,317
Día 100 gestación	0,314	0,416	0,518									
Día 7 post-parto	0,409	0,451	0,741									
Día 27 post-parto	0,802	0,898	1,162									
α -Tocoferol calostro y leche($\mu\text{g/ml}$)												
Calostro	11,159	12,829	12,615	2,201		0,7008			0,4082	0,5070	0,4367	0,9201
Leche a 7 días	3,718	4,961	3,622	1,386	1,255	0,0060	0,0001	0,3129	0,4528	0,3199	0,0246	0,002
Leche a 27 días	2,467	2,785	1,882									
α -Tocoferol suero lechón ($\mu\text{g/ml}$)												
Día 28	2,820	4,011	2,723	0,975	0,628	0,0090	0,0001	0,0004	0,0744	0,8239	0,0056	0,0098
Día 35	1,003	1,356	1,201									
Día 42	0,465	0,490	0,483									

¹ RMSE: Desviación estándar de los efectos principales e interacciones

² RMSE: Desviación estándar del tiempo y sus interacciones

Tabla V-7- Composición en ácidos grasos (%) del calostro de la cerda según el aporte de vitamina E a la cerda

Vitamina E cerda	30 ppm SINT	NAT 1/1	NAT 1/3	SEM ¹	Pr> F trat	CONTRASTES			
Acidos grasos calostro (%)						SINT vs NAT	SINT vs NAT 1/3	SINT vs NAT 1/1	NAT 1/3 vs NAT 1/1
C14:0	1,96	1,74	1,60	0,099	0,061	0,0247	0,0212	0,1085	0,3305
C16:0	26,33	24,76	24,96	0,578	0,124	0,0479	0,1171	0,0550	0,8148
C16:1n-7	3,74	3,49	3,86	0,218	0,450	0,8087	0,7055	0,3974	0,2307
C17:0	0,47	0,38	0,41	0,024	0,040	0,0186	0,0932	0,0129	0,4549
C17:1	0,47	0,40	0,45	0,018	0,025	0,0555	0,4610	0,0092	0,0628
C18:0	6,19	5,67	5,83	4,040	0,276	0,1426	0,3128	0,1161	0,6292
C18:1	36,57	34,94	36,82	1,132	0,418	0,6231	0,8787	0,2944	0,2444
C18:1 n-7	2,92	2,88	2,99	0,008	0,624	0,8559	0,5426	0,7364	0,3388
C18:2 n-6	21,21	25,50	22,89	1,734	0,198	0,1723	0,5153	0,0790	0,2926
C20:4	0,14	0,17	0,18	0,013	0,167	0,0669	0,0715	0,1651	0,5500
SAT	34,99	32,64	32,83	0,774	0,073	0,0257	0,0699	0,0334	0,8557
MUFA	43,69	41,70	44,12	1,319	0,636	0,6333	0,8246	0,2732	0,2013
PUFA	21,32	25,67	23,05	1,734	0,190	0,1651	0,5039	0,0751	0,2899
UI	0,87	0,93	0,91	0,023	0,126	0,0755	0,2619	0,0443	0,4077

¹SEM: n= 8

Tabla V-8 - Composición en ácidos grasos (%) de la leche de la cerda a los 7 días de lactación según el aporte de vitamina E a la cerda

Vitamina E cerda	30 ppm SINT	NAT 1/1	NAT 1/3	SEM ¹	Pr> F trat	CONTRASTES			
Acidos grasos leche 7 días (%)						SINT vs NAT	SINT vs NAT 1/3	SINT vs NAT 1/1	NAT 1/3 vs NAT 1/1
C14:0	2,95	2,98	2,75	0,175	0,628	0,7341	0,4522	0,8764	0,3797
C16:0	28,97	28,62	27,86	0,760	0,477	0,3282	0,2311	0,6200	0,4984
C16:1n-7	7,40	8,45	7,13	0,568	0,274	0,5783	0,7487	0,2185	0,1288
C17:0	0,29	0,28	0,31	0,019	0,525	0,9027	0,6312	0,5040	0,2631
C17:1	0,35	0,35	0,39	0,017	0,181	0,4948	0,1425	0,7693	0,0916
C18:0	5,88	5,82	5,75	0,494	0,597	0,3168	0,4077	0,3679	0,9181
C18:1	35,71	36,16	35,93	0,966	0,963	0,8349	0,7893	0,9246	0,8699
C18:1 n-7	2,20	2,06	2,30	0,065	0,070	0,9137	0,2510	0,1992	0,0226
C18:2 n-6	14,80	13,90	16,04	0,979	0,338	0,8648	0,3660	0,5542	0,1504
C18:3	1,19	1,15	1,31	0,080	0,375	0,6325	0,2784	0,8019	0,1982
C20:0	0,14	0,14	0,13	0,007	0,374	0,3475	0,1842	0,7672	0,3159
C20:4	0,11	0,09	0,12	0,008	0,127	0,4820	0,6722	0,1192	0,0545
SAT	38,23	37,84	36,79	0,961	0,711	0,7399	0,5031	0,9300	0,4634
MUFA	45,75	47,02	45,75	0,985	0,680	0,9029	0,7315	0,5915	0,3884
PUFA	16,10	15,15	17,47	1,056	0,334	0,8505	0,3560	0,5621	0,1486
UI	0,79	0,79	0,82	0,018	0,403	0,7666	0,3517	0,6850	0,1976

¹SEM: n= 8

Tabla V-9 - Composición en ácidos grasos (%) de la leche de la cerda a los 27 días de lactación según el aporte de vitamina E a la cerda

Vitamina E cerda	30 ppm SINT	NAT 1/1	NAT 1/3	SEM ¹	Pr> F trat	CONTRASTES			
Acidos grasos leche 27 días (%)						SINT vs NAT	SINT vs NAT 1/3	SINT vs NAT 1/1	NAT 1/3 vs NAT 1/1
C14:0	3,89	3,82	3,72	0,116	0,587	0,3983	0,3094	0,6262	0,5615
C16:0	34,74	35,72	33,50	1,011	0,318	0,9136	0,3934	0,5032	0,1355
C16:1n-7	9,73	10,79	10,18	0,707	0,574	0,3900	0,6532	0,2992	0,5493
C17:0	0,23	0,23	0,24	0,011	0,812	0,8579	0,8790	0,6447	0,5406
C17:1	0,32	0,30	0,34	0,016	0,285	0,7925	0,3121	0,5718	0,1223
C18:0	4,91	4,96	4,66	0,209	0,548	0,7020	0,4009	0,8547	0,3089
C18:1	30,76	29,87	31,77	1,398	0,638	0,9732	0,6166	0,6577	0,3491
C18:1 n-7	1,67	1,68	1,89	0,073	0,083	0,2138	0,0472	0,9120	0,0590
C18:2 n-6	12,49	11,49	12,47	0,336	0,079	0,2317	0,9705	0,0484	0,0522
C18:3	1,04	0,93	1,04	0,078	0,488	0,5562	0,9900	0,3063	0,3006
C20:0	0,12	0,12	0,11	0,005	0,331	0,8232	0,3525	0,5821	0,1460
C20:4	0,10	0,08	0,09	0,012	0,710	0,4321	0,5700	0,4268	0,8177
SAT	43,90	44,85	42,22	1,040	0,219	0,7793	0,2675	0,5244	0,0885
MUFA	42,48	42,65	44,18	1,138	0,520	0,5086	0,3027	0,9148	0,3538
PUFA	13,63	12,50	13,60	0,392	0,091	0,2432	0,9628	0,0549	0,0603
UI	0,71	0,69	0,73	0,011	0,065	0,8278	0,3043	0,1661	0,0213

¹SEM: n= 8

Tabla V-10 - Capacidad reductora del hierro plasmático (FRAP) y concentración de MDA en suero de lechones según el aporte de vitamina E a la cerda.

Vitamina E cerda	30 ppm SINT	NAT 1/1	NAT 1/3	RMS E ¹	RMS E ²	Pr> F trat	Pr> F tiempo	Tiempo * trat	CONTRASTES			
FRAP suero lechón (mM)									SINT vs NAT	SINT vs NAT 1/3	SINT vs NAT 1/1	NAT 1/3 vs NAT 1/1
Día 28	107,800	94,970	92,580	38,07	38,07	0,7604	0,0039	0,3567	0,7888	0,9112	0,5658	0,4935
Día 35	82,959	89,691	80,221									
Día 42	100,64	122,35	115,57									
MDA suero lechón (uM)												
Día 28	11,264	9,939	10,633	3,022	3,257	0,1133	0,0001	0,9862	0,0495	0,1722	0,0423	0,4862
Día 35	14,006	11,939	12,582									
Día 42	19,237	18,002	18,238									

¹ RMSE: Desviación estándar de los efectos principales e interacciones

² RMSE: Desviación estándar del tiempo y sus interacciones

Tabla V-11 - Inmunoglobulinas (mg/ml) del suero de lechones en función del aporte de vitamina E a la cerda.

Vitamina E cerda	30 ppm SINT	NAT 1/1	NAT 1/3	RMSE ¹	RMSE ²	Pr> F trat	Pr> F tiempo	Tiempo * trat	CONTRASTES ³			
									SINT vs NAT	SINT vs NAT 1/3	SINT vs NAT 1/1	NAT 1/3 vs NAT 1/1
Ig A (mg/ml)												
Día 28	0,275	0,304	0,251	0,002	0,001	0,1273	0,0001	0,1323	0,8668	0,2423	0,3758	0,0446
Día 35	0,314	0,332	0,271									
Día 42	0,357	0,361	0,359									
Ig M (mg/ml)												
Día 28	2,062	2,215	1,990	0,216	0,148	0,9003	0,0001	0,4572	0,7966	0,9711	0,684	0,7028
Día 35	2,493	2,401	2,643									
Día 42	2,814	2,957	2,755									
Ig G (mg/ml)												
Día 28	9,939	9,976	9,952	1,229	0,142	0,9884	0,3441	0,7062	0,9431	0,8977	0,996	0,8938
Día 35	10,281	10,211	10,102									
Día 42	9,885	9,910	10,249									

¹ RMSE: Desviación estándar de los efectos principales e interacciones² RMSE: Desviación estándar del tiempo y sus interacciones

V.3.- Ensayo 3

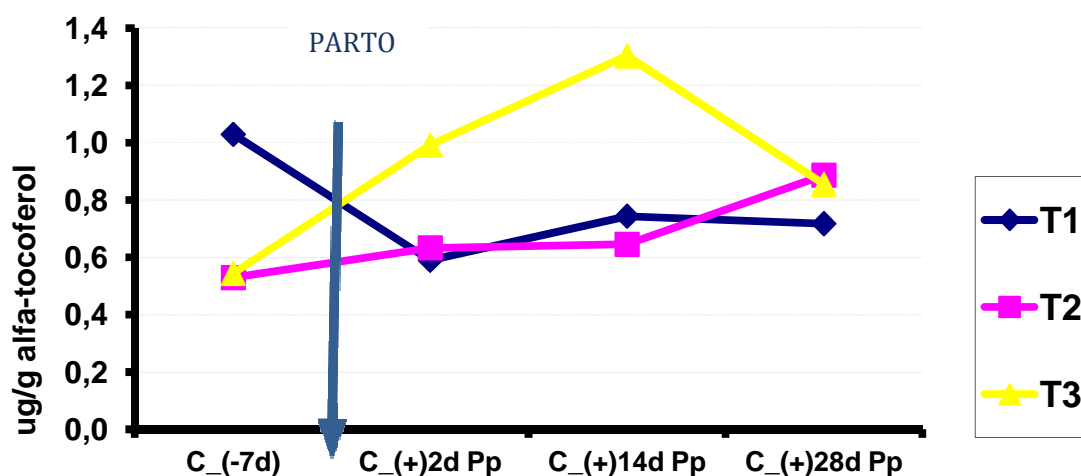
V.3.1.- Rendimientos productivos de los lechones

Los parámetros productivos: Peso vivo (PV), ganancia media diaria (GMD), consumo medio diario (CMD) e índice de transformación (IT) de los lechones en función del aporte de vitamina E de las madres se presentan en la *Tabla V-12*. En los análisis por contrastes ortogonales hemos observado efecto significativo tan solo en la fuente de vitamina E de la cerdas en el peso vivo a los 28 días de edad y en la GMD e IT de los lechones a los 42 días.

V.3.2.- Acumulación de alfa-tocoferol en diferentes tejidos

La Ilustración V-3 presenta la evolución del tocoferol de las madres desde el inicio del ensayo experimental (última semana de gestación) hasta el destete de los lechones.

Ilustración V-3 - Evolución de tocoferol de las madres desde los 7 días antes del parto hasta el destete.



Las concentraciones de α -tocoferol en suero, calostro y leche de cerdas suplementadas con α -tocoferol natural en el agua de bebida frente a los sintéticos alimentadas con el acetato de

α -tocoferol en el pienso (control) y de los lechones procedentes de estas madres a los 28 días de edad, se presentan en la **Tabla V-13**. No se observó efecto de tiempo en caso de las madres pero sí hubo una interacción tiempo*tratamiento. Respecto a los lechones se pudo observar un efecto en el tiempo de administración sin que observase interacción tiempo*tratamiento.

Por otra parte, se presenta el peso al sacrificio de los lechones y la acumulación de α -tocoferol en los diferentes tejidos al final de la prueba experimental en la **Tabla V-14** en la cual se puede observar que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos experimentales.

V.3.2.1.- Distribución relativa de estereoisómeros de α -tocoferol

La distribución relativa de los diferentes estereoisómeros de α -tocoferol contenidos en el músculo de los lechones a los 39 días de edad en función al tratamiento administrado se muestra en la **Tabla V-15**. Se pueden observar diferencias significativas en cuatro de los diferentes isómeros. También es interesante señalar el efecto del tratamiento aportado a las madres.

Tabla V-12 - Parámetros zootécnicos de los lechones en función al aporte de vitamina E del lechón entre los 28-42 días de edad.

Vit E cerda	30 ppm SINT			1/2 NAT		1/3 NAT				CONTRASTES ²				
Vit E lechón	1/2 NAT	1/3 NAT	15 ppm SINT	1/2 NAT	15 ppm SINT	1/3 NAT	15 ppm SINT	SEM ¹	Pr> F	1	2	3	4	5
Peso vivo a 28 días (kg)	7,46	7,55	7,57	8,11	8,04	8,23	8,19	0,401	0,5689	0,3817	0,7076	0,0363	0,7778	0,7315
Peso vivo a 42 días (kg)	9,52	9,49	9,78	9,99	10,62	10,11	10,45	0,540	0,6108	0,6456	0,9553	0,0759	0,9362	0,1929
GMD a 42 días (kg)	0,13	0,11	0,14	0,13	0,16	0,11	0,15	0,034	0,1289	0,8192	0,2598	0,2920	0,1071	0,0145
CMD a 42 días (kg)	0,23	0,22	0,24	0,24	0,24	0,21	0,23	0,039	0,6521	0,5579	0,1284	0,9074	0,2154	0,2356
IT a 42 días	1,74	1,98	1,81	1,89	1,57	1,99	1,57	0,442	0,2818	0,9023	0,7260	0,4751	0,2733	0,0409

¹SEM: n= 7²CONTRASTES: (1): SINT vs otros; (2): Efecto de la dosis de Vit E de las cerdas; (3): Efecto de la fuente de Vit E de las cerdas; (4) Efecto de la dosis de Vit E del lechón; (5): Efecto de la fuente de Vit E del lechón

Tabla V-13 - Concentración de alfa-tocoferol ($\mu\text{g/ml}$) en el suero, calostro y leche de cerdas durante la gestación y lactación y en el suero de los lechones hasta el destete (28 días).

Vit E cerda	30 ppm SINT	1/2 NAT	1/3 NAT	RMSE ¹	RMSE ²	Pr> F trat	Pr> F tiempo	Tiempo * trat	CONTRASTES ³			
Suero cerda (α -tocoferol)									1	2	3	4
Día (-7) pre-parto	1,158	0,605	0,726	0,662	0,351	0,2123	0,6716	0,0001	0,8756	0,0818	0,0002	0,0113
Día 2 post-parto	0,674	0,723	0,998									
Día 14 post-parto	0,744	0,646	1,303									
Día 28 post-parto	0,718	0,887	0,855									
Calostro y leche (α -tocoferol)												
Calostro	13,606	17,847	15,846	2,146					0,0668	0,3524		
Leche a 28 días	2,946	3,036	3,093	0,833					0,7099	0,8713		
Suero del lechón (α -tocoferol)												
Día 2 post-parto	4,286	4,032	5,389	1,454	1,307	0,1596	0,0001	0,6159	0,4758	0,0761	0,5796	0,4453
Día 14 post-parto	3,722	3,430	3,652									
Día 28 post-parto	1,941	2,140	2,917									

¹ RMSE: Desviación estándar de los efectos principales e interacciones

² RMSE Desviación estándar del tiempo y sus interacciones

³ CONTRASTES: (1): Efecto de la fuente de Vit E de la cerda; (2): Efecto de la dosis de Vit E de la cerda; (3) Tiempo x fuente; (4) Tiempo x dosis

Tabla V-14 - Acumulación de alfa-tocoferol ($\mu\text{g/g}$) en los tejidos de los lechones al sacrificio (39 días) en función del aporte de vitamina E a la cerda y lechón

Vit E cerda	30 ppm SINT			1/2 NAT		1/3 NAT				CONTRASTES ²				
Vit E lechón	1/2 NAT	1/3 NAT	15 ppm SINT	1/2 NAT	15 ppm SINT	1/3 NAT	15 ppm SINT	SEM ¹	Pr> F	1	2	3	4	5
Peso sacrificio (kg)	8,186	8,193	7,850	10,314	7,864	8,550	9,279	0,609	0,0601	0,164	0,775	0,050	0,156	0,302
α -Tocoferol suero	0,675	0,777	0,656	0,656	0,845	0,717	0,754	0,081	0,5810	0,331	0,853	0,513	0,314	0,457
α -Tocoferol músculo	3,909	4,247	4,210	3,805	4,060	3,759	3,738	0,484	0,9753	0,560	0,705	0,445	0,765	0,843
α -Tocoferol grasa	14,987	17,386	14,032	18,756	16,852	15,455	17,414	1,526	0,3151	0,082	0,374	0,159	0,769	0,637
α -Tocoferol hígado	5,651	5,921	5,732	6,668	6,224	6,613	5,527	0,684	0,9136	0,600	0,585	0,348	0,876	0,459

¹SEM: n= 7

²CONTRASTES: (1): SINT vs otros; (2): Efecto de la dosis de Vit E de las cerdas; (3): Efecto de la fuente de Vit E de las cerdas; (4) Efecto de la dosis de Vit E del lechón; (5): Efecto de la fuente de Vit E del lechón

Tabla V-15 - Composición en estereoisómeros de alfa-tocoferol (%) del músculo de lechones a los 39 días en función del aporte de vitamina E a la cerda y lechón.

Vit E cerda	30 ppm SINT			1/2 NAT		1/3 NAT				CONTRASTES ²				
Vit E lechón	1/2 NAT	1/3 NAT	15 ppm SINT	1/2 NAT	15 ppm SINT	18 ppm NAT	15 ppm SINT	SEM ¹	Pr>F	1	2	3	4	5
2S_MS	0,903	0,656	1,015	0,311	0,712	0,648	0,548	0,172	0,2189	0,0693	0,6526	0,0446	0,8154	0,3797
RSS_MS	13,620	12,719	12,809	7,118	7,096	6,555	7,162	0,763	0,0001	0,0003	0,7684	0,0001	0,3886	0,136
RRS_MS	18,409	16,740	17,845	11,797	9,786	11,390	12,117	0,746	0,0001	0,0001	0,2486	0,0001	0,2142	0,0412
RRR_MS	53,561	57,100	54,491	72,462	74,796	73,964	72,692	1,731	0,0001	0,0001	0,8752	0,0001	0,1946	0,044
RSR_MS	13,507	12,785	13,841	8,312	7,610	7,443	7,480	0,733	0,0001	0,0001	0,5392	0,0001	0,3306	0,1678

¹SEM: n= 7

²CONTRASTES: (1): SINT vs otros; (2): Efecto de la dosis de Vit E de las cerdas; (3): Efecto de la fuente de Vit E de las cerdas; (4) Efecto de la dosis de Vit E del lechón; (5): Efecto de la fuente de Vit E del lechón

V.3.3.- Perfil de ácidos grasos en tejidos y en secreciones

El perfil de ácidos grasos del calostro de las cerdas en función de la dosis y la fuente de vitamina E administrada a las cerdas se presenta en la **Tabla V-16**. Únicamente se observó que los animales suplementados con vitamina E sintética presentaron mayor contenido en C20:0 y C18:4 en el calostro que los suplementados con la forma natural. No se observaron diferencias significativas en el contenido total de ácidos grasos saturados, mono-insaturados o poli-insaturados.

Tabla V-16 - Composición en ácidos grasos (%) del calostro y leche de la cerda a los 28 días de lactación

Vit E madres	30 ppm SINT	1/2 NAT	1/3 NAT	SEM ¹	CONTRASTES ²	
					1	2
C10:0	0,14	0,11	0,11	0,036	0,4375	0,9400
C14:0	1,80	1,84	1,75	0,105	0,9512	0,4423
C16:0	24,11	24,55	23,74	0,515	0,9410	0,1737
C16:1 n-9	1,18	1,26	1,13	0,058	0,8214	0,0692
C16:1 n-7	3,58	3,81	3,75	0,236	0,3932	0,8143
C17:0	0,53	0,51	0,48	0,038	0,2911	0,5247
C17:1	0,38	0,40	0,38	0,017	0,3436	0,2416
C18:0	5,77	5,43	5,56	0,194	0,1480	0,5568
C18:1 n-9	34,16	34,29	35,36	0,749	0,3424	0,3161
C18:1 n-7	2,78	2,76	2,79	0,088	0,9569	0,7513
C18:2	21,62	21,08	20,99	0,740	0,4072	0,9019
C18:3 n-3	1,76	1,74	1,69	0,069	0,5390	0,5423
C18:4	0,17	0,15	0,12	0,009	0,0207	0,0789
C20:0	0,16	0,14	0,14	0,007	0,0347	0,6755
C20:1	0,40	0,39	0,43	0,020	0,6162	0,0936
C20:3	0,58	0,57	0,58	0,021	0,8163	0,6369
C20:4	1,08	1,12	1,08	0,049	0,7295	0,5102
SAT	32,42	32,52	31,74	0,561	0,5869	0,2293
MUFA	42,49	42,92	43,85	0,873	0,2794	0,2517
PUFA	25,10	24,57	24,41	0,813	0,4272	0,8666

¹SEM: n= 7

²CONTRASTES: (1): Efecto fuente (natural en agua vs sintética en pienso); (2): Efecto dosis (1/2 vs. 1/3)

El perfil de ácidos grasos de la leche de las cerdas en función de la dosis y la fuente de vitamina E administrada a las cerdas se presenta en la **Tabla V-17**. Se pueden observar, porcentajes similares de los ácidos grasos saturados, los mono-insaturados y los poli-insaturados entre los tratamientos experimentales. Las cerdas suplementadas con vitamina E sintética tuvieron un mayor porcentaje de C18:0 y menor C18:1 n-7 que las suplementadas con la vitamina E natural.

Tabla V-17 - Composición en ácidos grasos (%) de la leche de la cerda a los 28 días de lactación

Vit E madres	30 ppm SINT	1/2 NAT	1/3 NAT	SEM ¹	CONTRASTES ²	
					1	2
C10:0	0,25	0,25	0,24	0,020	0,9874	0,7026
C12:0	0,27	0,29	0,29	0,013	0,1510	0,9552
C14:0	3,47	3,61	3,57	0,126	0,3638	0,2080
C16:0	33,69	32,91	32,56	0,856	0,3154	0,7563
C16:1 n-7	9,26	10,19	9,28	0,474	0,3711	0,1582
C17:0	0,26	0,26	0,23	0,016	0,5510	0,2196
C17:1	0,27	0,31	0,27	0,017	0,4883	0,0483
C18:0	4,73	4,24	4,30	0,199	0,0445	0,8115
C18:1 n-9	29,62	29,10	29,46	1,087	0,7705	0,7979
C18:1 n-7	1,23	1,98	1,86	0,266	0,0260	0,7380
C18:2	14,33	14,98	15,2	0,420	0,1078	0,6831
C18:3 n-3	1,27	1,31	1,342	0,045	0,2039	0,6135
C18:4	0,12	0,14	0,14	0,010	0,2006	0,9315
C20:0	0,10	0,11	0,10	0,012	0,4567	0,5682
C20:1	0,38	0,38	0,38	0,032	0,9329	0,8242
C20:3	0,31	0,33	0,32	0,032	0,8012	0,8207
C20:4	0,49	0,51	0,47	0,062	0,9265	0,5649
SAT	42,71	41,54	41,30	0,868	0,1858	0,8352
MUFA	40,78	41,53	41,24	0,909	0,5469	0,8139
PUFA	16,51	17,27	17,46	0,479	0,1123	0,7542

¹SEM: n= 7

²CONTRASTES: (1): Efecto fuente (natural en agua vs sintética en pienso); (2): Efecto dosis (1/2 vs. 1/3)

El perfil de ácidos grasos del tejido graso y del tejido muscular de los lechones en función de la dosis y la fuente de vitamina E administrada a las cerdas o a los lechones destetados se presenta en las **Tabla V-18** y **Tabla V-19**. Observamos resultados reflejando cifras numéricamente similares en los diferentes ácidos grasos para los diferentes tratamientos experimentales. Tan solo se observaron diferencias significativas en los análisis de contrastes ortogonales de la grasa subcutánea de los lechones en función de la dosis y fuente de vitamina E de las cerdas. No se han observado diferencias significativas en los ácidos grasos del músculo.

V.3.4.- Estatus oxidativos de los lechones

El poder reductor del hierro plasmático (FRAP) y la concentración de glutatión del suero de los lechones de los diferentes tratamientos experimentales se puede observar en la Tabla V-20. Hemos observado diferencias significativas ($P < 0,05$) en caso del FRAP del suero de los lechones. No hubo diferencias significativas en el contenido en glutatión total, oxidado o reducido entre los diferentes tratamientos experimentales.

La concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) del suero de los lechones se presenta en la Tabla V-21. Las cifras son numéricamente similares y se observaron diferencias significativas por la fuente de suplementación de las madres ($P > 0.05$). De forma que los menores valores de TBARS se detectaron en el suero de los lechones procedentes de madres que habían sido suplementadas con vitamina E natural en comparación con las que habían sido suplementadas con la forma sintética. Además hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las diferentes lecturas en el tiempo. No hubo interacción tiempo*tratamiento.

La concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS); del tejido hepático de los lechones se presenta en la Tabla V-22. Entre los diferentes tratamientos, las concentraciones de TBARS son similares ($P > 0.05$) entre los diferentes tratamientos experimentales pero sí hubo un efecto del tiempo ($P < 0.001$). No hubo interacción tiempo*tratamiento.

V.3.5.- Respuesta inmune de los lechones

La respuesta inmune (las concentraciones de inmunoglobulinas IgM, IgA e IgG) en el suero de los lechones correspondientes a los diferentes tratamientos experimentales en diferentes etapas de la vida se presentan en las y **Tabla V-24** respectivamente. En la **Tabla V- 23** se pueden observar diferencias significativas ($P < 0,05$) en el caso de la inmunoglobulina A entre los diferentes tratamientos experimentales. A los 28 días de edad los lechones procedentes de cerdas suplementadas con la vitamina E sintética tuvieron valores numéricamente inferiores de IgA que los que procedían de madres que habían sido suplementadas con la forma natural. También se observaron diferencias significativas en la concentración de inmunoglobulinas (IgA, IgG y IgM) con el tiempo. Así, IgA e IgG tendieron a disminuir con la edad del animal, mientras que la IgM que mostró un intenso descenso entre los 2 a 14 días, se incrementó entre los 14 a 28 días.

A los 39 días de edad los lechones no mostraron diferencias ($P > 0,05$) entre la concentración de inmunoglobulinas del suero entre los diferentes tratamientos experimentales.

Tabla V-18 - Composición en ácidos grasos (%) de la grasa subcutánea de lechones a 39 días de edad en función del aporte de vitamina E a la cerda o al lechón destetado.

Vit E cerda	30 ppm SINT			1/2 NAT		1/3 NAT		SEM ¹	CONTRASTES ²				
Vit E lechón	1/2 NAT	1/3 NAT	15 ppm SINT	1/2 NAT	15 ppm SINT	1/3 NAT	15 ppm SINT		1	2	3	4	5
C12:0	0,06	0,06	0,06	0,05	0,06	0,07	0,05	0,002	0,7272	0,0630	0,3531	0,1610	0,1383
C15:0	0,11	0,12	0,11	0,12	0,11	0,12	0,12	0,008	0,3675	0,7246	0,7290	0,5363	0,6232
C16:0	28,75	29,58	29,01	28,33	28,34	29,43	29,24	0,796	0,9372	0,2153	0,6436	0,2296	0,7868
C16:1 n-7	8,19	7,89	8,61	8,41	9,10	8,76	8,27	0,313	0,5885	0,4467	0,1008	0,9321	0,1524
C17:0	0,26	0,27	0,25	0,26	0,26	0,27	0,28	0,017	0,3460	0,3663	0,6520	0,6104	0,7502
C17:1	0,31	0,30	0,30	0,33	0,32	0,32	0,31	0,015	0,4225	0,4002	0,1140	0,5817	0,6537
C18:0	6,93	6,56	6,70	6,83	6,54	7,48	7,55	0,373	0,4577	0,0315	0,1973	0,7048	0,9270
C18:1 n-9	36,64	35,65	35,86	36,43	35,91	34,53	34,69	0,995	0,8335	0,1243	0,3842	0,1531	0,6646
C18:1 n-7	3,19	2,99	3,43	3,02	3,22	3,43	3,13	0,159	0,1172	0,3139	0,9906	0,4975	0,4006
C18:2	11,36	12,37	11,47	12,07	11,94	11,34	12,18	0,534	0,4584	0,6467	0,7106	0,7959	0,8450
C18:3 n-3	0,69	0,75	0,75	0,76	0,73	0,75	0,79	0,043	0,9764	0,5685	0,4208	0,5383	0,6155
C18:4	0,08	0,08	0,08	0,10	0,09	0,10	0,10	0,004	0,0105	0,7883	0,0001	0,5738	0,5153
C20:0	0,13	0,12	0,12	0,10	0,12	0,13	0,13	0,013	0,8950	0,1397	0,6770	0,3989	0,6582
C20:1	0,73	0,68	0,70	0,61	0,65	0,64	0,63	0,051	0,4158	0,9248	0,0598	0,8358	0,8521
C20:3	0,44	0,43	0,41	0,41	0,41	0,41	0,40	0,028	0,8572	0,7789	0,2556	0,8626	0,4881
C20:4	0,24	0,26	0,21	0,28	0,24	0,25	0,25	0,018	0,0330	0,4603	0,2448	0,6043	0,0788
SAT	38,12	38,59	38,21	37,58	37,39	39,49	39,25	0,845	0,8240	0,0308	0,8510	0,1672	0,8035
MUFA	49,07	47,57	48,89	48,80	49,20	47,67	47,03	0,932	0,4790	0,0845	0,6493	0,1605	0,8814
PUFA	12,82	13,89	12,90	13,63	13,42	12,84	13,72	0,580	0,4157	0,6784	0,6474	0,8060	0,9020

¹SEM: n= 7

² CONTRASTES: (1): SINT vs otros; (2): Efecto de la dosis de Vit E de las cerdas; (3): Efecto de la fuente de Vit E de las cerdas; (4) Efecto de la dosis de Vit E del lechón; (5): Efecto de la fuente de Vit E del lechón

Tabla V-19 - Composición en ácidos grasos (%) del músculo de lechones a 39 días de edad en función del aporte de vitamina E a la cerda y el lechón.

Vit E cerda	30 ppm SINT			1/2 NAT		1/3 NAT		SEM ¹	CONTRASTES ²				
Vit E lechón	1/2 NAT	1/3 NAT	15 ppm SINT	1/2 NAT	15 ppm SINT	1/3 NAT	15 ppm SINT		1	2	3	4	5
C10:0	0,39	0,41	0,33	0,38	0,37	0,37	0,43	0,077	0,4029	0,7440	0,8671	0,9844	0,8318
C12:0	0,25	0,22	0,17	0,17	0,18	0,20	0,22	0,025	0,1477	0,1672	0,3172	0,9680	0,3123
C14:0	1,64	1,61	1,79	1,79	1,77	1,81	1,57	0,119	0,4697	0,4666	0,5193	0,9841	0,9647
C16:0	26,89	26,43	27,12	27,31	26,47	27,64	26,46	0,874	0,7753	0,8604	0,8169	0,9408	0,5610
C16:1 n-7	6,38	6,00	7,28	7,31	7,44	7,42	6,39	0,489	0,3661	0,3427	0,1199	0,7836	0,4867
C17:0	0,42	0,45	0,39	0,41	0,40	0,40	0,48	0,034	0,2617	0,2470	0,9145	0,6617	0,9973
C17:1	0,35	0,26	0,26	0,27	0,26	0,25	0,43	0,064	0,5323	0,2609	0,7986	0,5042	0,5091
C18:0	9,19	9,19	8,42	8,46	8,69	8,94	9,88	0,504	0,2188	0,1054	0,8793	0,6366	0,9000
C18:1 n-9	27,61	26,87	28,64	28,15	27,63	26,96	25,79	1,204	0,2388	0,2156	0,5322	0,4263	0,9600
C18:1 n-7	4,12	3,98	4,04	3,89	4,17	4,05	4,30	0,221	0,8483	0,5049	0,7565	0,9528	0,3524
C18:2	16,44	17,53	15,91	16,41	16,46	16,24	17,68	0,851	0,3152	0,5366	0,9117	0,5891	0,9633
C18:3 n-3	0,76	0,84	0,81	0,81	0,79	0,80	0,82	0,040	0,8245	0,8351	0,9735	0,4482	0,9319
C18:4	0,15	0,16	0,13	0,16	0,11	0,18	0,16	0,021	0,4756	0,4210	0,8574	0,7564	0,3235
C20:0	0,24	0,21	0,17	0,17	0,15	0,16	0,19	0,021	0,4643	0,6864	0,0996	0,4666	0,2862
C20:1	0,57	0,55	0,56	0,51	0,56	0,50	0,50	0,040	0,5675	0,4449	0,2328	0,6871	0,8176
C20:3	0,56	0,57	0,52	0,49	0,53	0,49	0,52	0,037	0,7825	0,9818	0,1364	0,8625	0,8024
C20:4	4,25	4,99	3,64	3,63	4,34	3,79	4,64	0,721	0,3965	0,7527	0,7236	0,5361	0,9392
SAT	38,92	38,44	38,33	38,50	37,93	39,45	39,09	0,650	0,5613	0,1119	0,7160	0,7208	0,4459
MUFA	39,03	37,59	40,74	40,09	39,94	39,15	37,23	1,418	0,1954	0,2056	0,9860	0,4065	0,7555
PUFA	22,05	23,98	20,93	21,41	22,14	21,39	23,69	1,519	0,3339	0,6163	0,8890	0,5330	0,9707

¹SEM: n= 7

²CONTRASTES: (1): SINT vs otros; (2): Efecto de la dosis de Vit E de las cerdas; (3): Efecto de la fuente de Vit E de las cerdas; (4) Efecto de la dosis de Vit E del lechón; (5): Efecto de la fuente de Vit E del lechón

Tabla V-20 - Capacidad reductora del hierro sérico (FRAP) y glutatión total, oxidado o reducido en suero y músculo de lechones de 39 días de edad.

Vit E cerda	30 ppm SINT			1/2 NAT		1/3 NAT				CONTRASTES ²				
	1/2 NAT	1/3 NAT	15 ppm SINT	1/2 NAT	15 ppm SINT	1/3 NAT	50 ppm SINT	SEM ¹	Pr>F	1	2	3	4	5
FRAP suero (mM)	126,080	129,808	113,896	224,617	208,367	207,874	214,213	36,027	0,2793	0,1684	0,8922	0,0091	0,8744	0,8360
Suero del lechón														
GSHt (uM)	9,646	6,507	5,467	7,550	6,589	5,808	5,881	1,297	0,2888	0,2255	0,3508	0,4430	0,0677	0,1561
GSSH (uM)	0,901	0,826	0,834	1,026	1,003	0,692	0,646	0,272	0,9428	0,9594	0,2127	0,9552	0,4580	0,8727
GSH libre (uM)	8,745	5,680	4,933	6,524	5,586	5,115	5,234	1,281	0,3963	0,3862	0,4965	0,3977	0,0897	0,2045
GSSH/GSHt (%)	9,338	12,700	15,255	13,588	15,221	11,915	10,985	6,327	0,8202	0,4679	0,8600	0,2544	0,4626	0,5093

¹SEM: n= 7²CONTRASTES: (1): SINT vs otros; (2): Efecto de la dosis de Vit E de las cerdas; (3): Efecto de la fuente de Vit E de las cerdas; (4) Efecto de la dosis de Vit E del lechón; (5): Efecto de la fuente de Vit E del lechón**Tabla V-21 - Concentración de MDA (μ M) obtenida por oxidación inducida por hierro del suero de lechones a 39 días de edad.**

Vit E cerda	30 ppm SINT			1/2 NAT		1/3 NAT		RMSE ¹	RMSE ²	Pr> F trat	Pr> F tiempo	Tiempo * trat	CONTRASTES ³				
	1/2 NAT	1/3 NAT	15 ppm SINT	1/2 NAT	15 ppm SINT	1/3 NAT	15 ppm SINT						1	2	3	4	5
0 min	10,011	10,011	9,120	9,024	10,149	10,011	9,243	0,008	0,011	0,0279	0,0001	0,3353	0,088	0,275	0,038	0,092	0,477
15 min	10,258	11,081	11,23	9,298	10,121	10,395	10,258										
30 min	12,837	12,398	13,25	12,51	11,904	13,495	11,355										

¹RMSE: Desviación estándar de los efectos principales e interacciones²RMSE Desviación estándar del tiempo y sus interacciones³CONTRASTES: (1): SINT vs otros; (2): Efecto de la dosis de Vit E de las cerdas; (3): Efecto de la fuente de Vit E de las cerdas; (4) Efecto de la dosis de Vit E del lechón; (5): Efecto de la fuente de Vit E del lechón

Tabla V-22 - Concentración de MDA ($\mu\text{M/g}$) obtenida por oxidación inducida con hierro del tejido hepático de lechones a 39 días de edad en función del aporte de vitamina E.

Vit E cerda	30 ppm SINT			1/2 NAT		1/3 NAT		RMSE ¹	RMSE ²	Pr> F trat	Pr> F tiempo	Tiempo * trat	CONTRASTES ³				
Vit E lechón	1/2 NAT	1/3 NAT	15 ppm SINT	1/2 NAT	15 ppm SINT	1/3 NAT	15 ppm SINT						1	2	3	4	5
0 minutos	1,005	1,053	0,925	1,209	1,101	1,096	1,140	0,061	0,016	0,3498	0,0001	0,1312	0,070	0,192	0,336	0,485	0,201
30 minutos	1,133	1,141	1,081	1,382	1,238	1,336	1,252										
60 minutos	1,269	1,246	1,176	1,435	1,334	1,415	1,342										
120 minutos	1,892	1,978	1,700	1,670	1,642	1,859	1,991										
180 minutos	2,513	2,457	2,439	2,438	2,308	2,429	2,552										
240 minutos	2,690	2,785	2,686	2,640	2,569	2,807	2,733										

¹ RMSE: Desviación estándar de los efectos principales e interacciones

² RMSE: Desviación estándar del tiempo y sus interacciones

³ CONTRASTES: (1): SINT vs otros; (2): Efecto de la dosis de Vit E de las cerdas; (3): Efecto de la fuente de Vit E de las cerdas; (4) Efecto de la dosis de Vit E del lechón; (5): Efecto de la fuente de Vit E del lechón

Tabla V-23 - Concentraciones de inmunoglobulinas (mg/ml) del suero de lechones desde el día 2 al 28 de vida en función del aporte de vitamina E a la cerda.

Vit E cerda	IgA			IgG			IgM		
	30 ppm SINT	1/2 NAT	1/3 NAT	30 ppm SINT	1/2 NAT	1/3 NAT	30 ppm SINT	1/2 NAT	1/3 NAT
Día 2	4,083	5,645	2,578	44,027	28,069	29,836	2,877	2,740	3,035
Día 14	0,162	0,124	0,101	13,363	13,658	14,022	0,633	0,639	0,556
Día 28	0,099	0,135	0,142	5,643	8,870	7,055	0,955	1,014	1,488
RMSE ¹	0,2702			78,3213			0,3602		
RMSE ²	0,2554			29,573			0,6032		
Pr> F trat	0,0031			0,6192			0,6087		
Pr> F tiempo	0,0001			0,0001			0,0002		
Tiempo * trat	0,0026			0,1318			0,8475		
CONTRASTES									
1	0,9741			0,3447			0,6801		
2	0,0009			0,9776			0,3758		
3	0,9755			0,0238			0,8679		
4	0,0001			0,8050			0,7673		

¹ RMSE: Desviación estándar de los efectos principales e interacciones

² RMSE: Desviación estándar del tiempo y sus interacciones

³ CONTRASTES: (1): Efecto de la fuente de Vit E de la cerda; (2): Efecto de la dosis de Vit E de la cerda; (3) Tiempo x fuente; (4)

Tabla V-24 - Concentraciones de inmunoglobulinas (mg/ml) del suero de lechones en función del aporte de vitamina E de la cerda o al lechón.

Vit E cerda	30 ppm SINT			1/2 NAT		1/3 NAT				CONTRASTES ²				
	15			15										
Vit E lechón	1/2 NAT	1/3 NAT	ppm SINT	1/2 NAT	ppm SINT	1/3 NAT	15 ppm SINT	SEM ¹	Pr>F	1	2	3	4	5
IgA	0,189	0,115	0,109	0,167	0,116	0,172	0,168	0,024	0,2572	0,1457	0,3152	0,4107	0,2406	0,1813
IgG	3,701	8,781	6,566	7,191	4,177	5,328	7,131	1,561	0,4677	0,7982	0,7701	0,7826	0,3912	0,8373
IgM	1,781	2,191	1,676	1,868	1,504	1,947	2,653	0,326	0,4675	0,4560	0,1229	0,7106	0,5318	0,9931

¹SEM: n= 7² CONTRASTES: (1): SINT vs otros; (2): Efecto de la dosis de Vit E de las cerdas; (3): Efecto de la fuente de Vit E de las cerdas; (4) Efecto de la dosis de Vit E del lechón; (5): Efecto de la fuente de Vit E del lechón

VI. DISCUSIÓN

VI. DISCUSIÓN

VI.1.- Ensayo 1

Como se ha indicado en la revisión bibliográfica de esta Tesis Doctoral, la cantidad de vitamina E que se incluye en piensos para cerdas reproductoras o lechones destetados es muy variable, pudiéndose encontrar concentraciones hasta 10-12 veces superior en unas empresas que en otras. La divergencia se explica por la diferente orientación productiva, costes de materias primas, etc.

Esta Tesis doctoral pretende estudiar las posibilidades de utilizar vitamina E natural como alternativa a las formas sintéticas en los momentos más comprometidos del ciclo productivo porcino. El primer ensayo se ha desarrollado de un modo exploratorio y para ello se ha decidió añadir vitamina E natural en forma soluble (en el agua de bebida) en piensos que ya incluían una cantidad elevada de la forma sintética. Es decir, en una situación en la que la absorción está fuertemente comprometida por la competitividad con el alto nivel basal incluido en el pienso. El trabajo pretende observar también si en los grupos que no se suplementan con vitamina E natural los lechones tienen una disminución marcada en la concentración de vitamina E tras el destete y cómo la suplementación, tanto en madres durante la lactación como en lechones destetados puede permitir minimizar este descenso.

VI.2.1.- Rendimientos productivos de cerdas y lechones

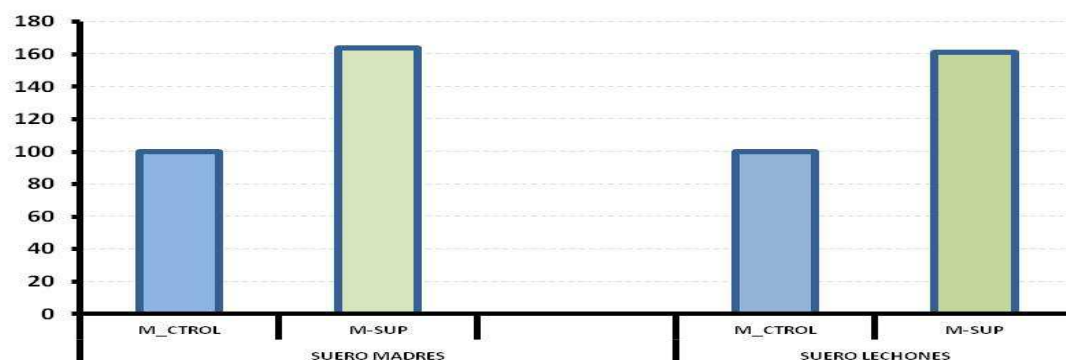
La suplementación de vitamina E natural de las cerdas no afectó significativamente al número de nacidos total ($8,6 \pm 2,2$), nacidos vivos ($7,8 \pm 2,2$), lechones destetados ($7,1 \pm 0,8$), el peso de lechones al destete ($5,8 \text{ kg} \pm 0,9$) o la ganancia media diaria (GMD) de los lechones durante la lactancia ($0,20 \pm 0,03 \text{ kg}$). Por otra parte, la suplementación de vitamina E en el agua de bebida a los lechones después del destete no modificó la ganancia diaria (GMD) ($0,38 \pm 0,05 \text{ kg}$). No existe mucha información en la literatura sobre el efecto

de la suplementación con vitamina E natural en el agua de bebida sobre estos parámetros. Wilburn et al. (2008) no encontraron ningún efecto de la adición de vitamina E natural a la dieta o el agua de bebida sobre la ganancia media diaria (GMD) durante el período posterior al destete, pero hasta donde sabemos no existe más información sobre este tema.

VI.2.2.- Acumulación de tocoferoles.

Las concentraciones de α -tocoferol (*Tabla V-1*) en el suero y leche para el grupo M-Ctrol fueron similares a los valores encontrados por otros autores que usaron aporte parecido de vitamina E (Lauridsen y Jensen, 2005). Las cerdas suplementadas con vitamina E natural en el agua de bebida tuvieron una mayor concentración de α -tocoferol en suero en los días 5 y 20 después del destete que las del grupo M-Ctrol ($P = 0,0001$). Este resultado era esperado ya que las cerdas del grupo M-Sup recibieron la vitamina E en el agua de bebida de forma simultánea con la forma sintética en la alimentación. El grupo de las M-Sup tuvo entre 1.2 y 1.6 veces mayor concentración de α -tocoferol en el suero que el grupo M-Ctrol (*Ilustración VI-1*). Este es un hecho destacado, ya que el aporte de tocoferol natural en el grupo M-Sup fue solo un 10-15% superior al de las cerdas de grupo M-Ctrol, lo que hace suponer que en individuos adultos (con pleno potencial digestivo), como es el caso de la cerda reproductora, la absorción de vitamina E natural es notablemente más eficiente que la forma sintética. También se encontró un aumento de la concentración de α -tocoferol con el tiempo ($P = 0,0001$) y este efecto se observó principalmente en el grupo M-Sup ($P = 0,0005$).

Ilustración VI-1 - Concentración de alfa-tocoferol en el suero de las cerdas reproductoras y lechones en el día 28 de lactación.



M-Ctrol= madres que recibieron el pienso control como única fuente de vitamina E, M-Sup= Madres suplementadas con vitamina E natural en el agua). En cada caso se expresa porcentualmente respecto al grupo control, al que se asigna un valor de 100.

Es interesante observar que el día del destete, la concentración de α -tocoferol del suero fue mayor en los lechones procedentes de las cerdas que se suplementaron con vitamina E natural en el agua de bebida (**Ilustración V-2** y **Ilustración VI-1**). Este efecto está relacionado con el descenso en el suero de cerdas y se explica en parte por una acumulación más eficiente de la forma natural (Chung et al, 1992.; Lauridsen et al, 2002; Mahan et al, 2000).

Además, el grupo de las M-Sup tenían valores más elevados de vitamina E en la leche a los 20 días después del parto que en el grupo M-Ctrol (**Ilustración V-1**) (3,27 vs 2,93), aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. En estudios anteriores se ha observado que la forma natural de vitamina E produce mayor concentración de α -tocoferol en el suero de las cerdas que las formas sintéticas (Mahan et al., 2000). Sin embargo, no existe ningún estudio en la literatura en la que el agua de bebida se utilice como vehículo para la suplementación de vitamina E en cerdas o de sus posibles efectos sobre la vitamina E en suero de lechones.

Por otra parte, se observa que la concentración de α -tocoferol en suero del lechón disminuye con el tiempo ($P = 0,0001$), especialmente durante los días inmediatamente posteriores al destete. Algunos autores han descrito anteriormente este efecto tanto si se aporta la forma sintética de vitamina E (Lauridsen y Jensen, 2005; Lauridsen et al, 2002, Moreira y Mahan, 2002) como la forma natural en el agua de bebida (Wilburn et al., 2008) y lo atribuyen al bajo consumo de alimento y agua (debido al estrés post-destete) y a la baja absorción de las vitaminas liposolubles (*Ilustración V-2*). De acuerdo con los resultados del presente estudio, esta disminución fue más intensa en los grupos M-Ctrol_L-Ctrol y M-Sup_L-Ctrol en un (65%), y de menor magnitud en los grupos M-Ctrol_L-Sup y M-Sup_L-Sup en un (47%). Por otra parte, se observó una interacción entre el efecto de las madres y la suplementación de los lechones ($P = 0,0058$), de modo que los lechones recibieron de vitamina E natural en el agua de bebida procedentes de las cerdas suplementadas (M-Sup_L-Sup) tuvieron la concentración más elevada de α -tocoferol en suero después de 5 días post-destete. La concentración más baja de α -tocoferol en suero se encontró en lechones que provinieron del grupo M-Ctrol_L-Ctrol, mientras que valores intermedios se encontraron en los lechones procedentes de los grupos M-Ctrol_L-Sup o M-Sup_L-Ctrol a los 5 días post-destete. Como ocurrió en las madres, la concentración de α -tocoferol fue 1,6 veces mayor en los grupos suplementados con vitamina E natural en el agua de bebida en comparación con la forma sintética a los 5 días después del destete. Después de los 20 días post-destete, los grupos M-Ctrol_L-Sup y M-Sup_L-Ctrol tuvieron concentraciones similares de α -tocoferol en suero que el grupo M-Sup_L-Sup (interacción madre*lechón*tiempo, $P = 0,007$), aunque se situó entre 1,1 y 1,7 veces mayor cuando los lechones fueron suplementados con vitamina E natural en el agua de bebida que en los otros grupos.

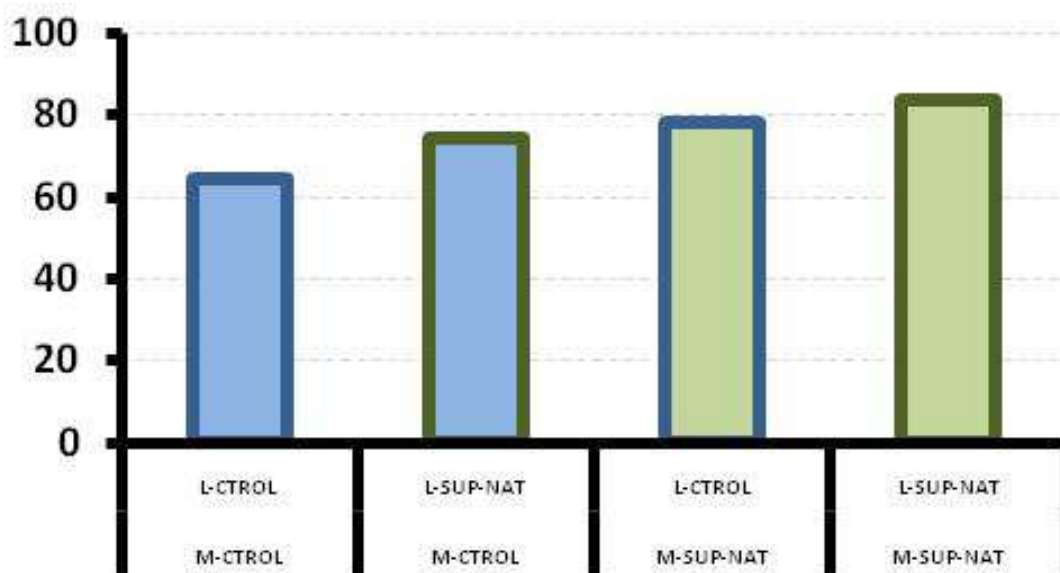
Existe muy poca información en la literatura sobre los efectos de la suplementación con vitamina E en el agua de bebida sobre niveles de α -tocoferol del suero de lechones. Wilburn et al. (2008) añadieron la forma alcohol de la vitamina E natural en el agua de bebida, y encontraron una más rápida absorción que cuando la vitamina E se proporcionaba en el pienso, por lo que el descenso post-destete no fue tan marcado en sus animales. Estos autores también encontraron un mayor incremento (1,2 y 0,84 veces a los 3 y 21 días, respectivamente), cuando la suplementación de vitamina E natural en la dieta (300 UI / kg) se comparó con la suplementación en el agua de bebida (100 UI / kg), lo que indica que la suplementación en el agua de bebida al destete fue más eficaz en el mantenimiento de niveles de tocoferol en suero. Por lo tanto, nuestros resultados son coincidentes con los de Wilburn et al. (2008) e indican que el aporte de vitamina E natural en el agua de bebida parece ser un método más eficaz para evitar un descenso dramático de la vitamina E del suero tras el destete. Además, de acuerdo con los resultados del presente estudio, el efecto de este tratamiento puede ser explicado principalmente por la suplementación de vitamina E de los lechones ($P = 0,0001$) dado que el efecto de la suplementación de las cerdas no fue estadísticamente significativa. Sin embargo, el grupo M-Sup_L-Ctrol, así como los grupos M-Sup_L-Sup y L-Sup_M-Ctrol alcanzaron valores superiores a 1,5 $\mu\text{g/ml}$ en el suero (que se considera como una referencia para mantener de modo satisfactorio el estatus de vitamina E en cerdos) (Wilburn et al., 2008). En un estudio similar, Nemec et al. (1994) encontraron que los cerdos nacidos de cerdas que recibieron altos niveles de vitamina E (88 UI / kg de vitamina E sintética) tuvieron una concentración más alta de α -tocoferol en suero, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Del mismo modo, otros autores han encontrado una tendencia a una mayor concentración en lechones amamantados de cerdas que recibieron altos niveles de DL- α -tocoferol acetato (Hidioglou et al. 1993; Pinelli-Saavedra et al, 2008) o de acetato de D- α -tocoferol (Mahan et al., 2000).

Finalmente cabe añadir que el incremento en la concentración de vitamina E sérica observada en lechones como consecuencia de la suplementación en el agua de bebida es de mayor intensidad de lo que cabría esperar teniendo en cuenta la cantidad realmente suplementada (alrededor de un 10-15% de la aportada en el pienso). Ello indica que la absorción y acumulación de la vitamina E natural es aparentemente más eficiente que la forma sintética. Estos resultados permiten concluir que la suplementación de vitamina E natural en agua de bebida es efectiva incluso cuando el pienso tiene una concentración basal de la forma sintética elevada.

VI.2.3.- Estatus oxidativo de los lechones

La suplementación con vitamina E natural en el agua de bebida afectó significativamente al estatus oxidativo (estimado por el FRAP) de los lechones (**Tabla V-2**) ($P=0.037$), lo que está en concordancia con las diferencias observadas en la concentración de vitamina E. Bardos et al. (2000) encontraron baja correlación entre FRAP y los niveles séricos de α -tocoferol, mientras que otros autores observaron que un incremento del nivel de α -tocoferol en suero produce un mayor FRAP (Benzie y Strain, 1999; Hamilton et al, 2000), aunque la contribución estimada de α -tocoferol al FRAP total fue de sólo el 5% (Benzie y Strain, 1999). El FRAP de suero se incrementó significativamente ($P = 0,025$) con el tiempo y este efecto fue más marcado a partir del día 5 tras el destete en los grupos M-Sup_L-Sup y M-Ctrol_L-Sup en comparación con el grupo M-Sup_L-Ctrol y los grupos M-Ctrol-L-Ctrol (interacción entre tiempo*tratamiento, $P = 0,02$), lo que avala el efecto antioxidante in vivo de la suplementación de vitamina E natural en el agua de bebida (**Ilustración VI-2**). En el grupo M-Ctrol_L-Ctrol (sin suplementación a la madre ni al lechón) el FRAP disminuyó después del día 5, lo que indicaría un descenso del poder antioxidante de estas muestras de suero.

Ilustración VI-2 - Valor FRAP en suero de lechones a las dos semanas del destete. (M= Madre, L= Lechón, Ctrol= grupo que no recibió suplemento de vitamina E natural, Sup Nat= grupo suplementado con vitamina E natural en el agua de bebida)



Las concentraciones de glutatión libre (GSH) y oxidado (GSSH) (*Tabla V-3*) en plasma se consideran como un indicador útil del riesgo de enfermedad (Jones et al., 2000) ya que el GSH se convierte en GSSH durante el proceso de estrés oxidativo. En el presente estudio, la suplementación con vitamina E natural en el agua de bebida de los lechones y / o sus madres afectó las concentraciones de GSH y GSSH. El grupo suplementado con vitamina E natural en el agua de bebida tuvo menor concentración de GSSH que los demás grupos. Por consiguiente se observó un efecto de la suplementación con vitamina E natural ($P=0.0019$). Sin embargo, es interesante observar que después de 5 días post-destete el valor GSSH fue mayor que en el día inicial, lo que concuerda con el aumento del estrés que sufren los lechones durante el proceso post-destete (efecto tiempo = 0,0001). El aumento de la GSSH fue del 44% para el grupo M-Ctrol_L-Ctrol, seguido del grupo M-Sup_L-Ctrol (42 %), mientras que en los otros grupos el estrés oxidativo fue considerablemente menos pronunciado: 16% para el M-Sup_L-Sup, 34% para el M-Ctrol_L-Sup. Tras 20 días post-destete se observó una disminución de la GSSH. Además, después de los 20 días, el grupo M-Sup_L-Sup tuvo menos GSSH en comparación con el grupo M-Ctrol_L-Ctrol, mientras

que los grupos M-Ctrol_L-Sup y M-Sup_L-Ctrol alcanzaron valores intermedios. Por lo tanto, es interesante observar una disminución efectiva de GSSH cuando los lechones y sus madres se suplementan en el agua de bebida en lugar de proporcionar una única suplementación a los lechones.

Shang et al. (2003) demostraron el papel de la vitamina E en el mantenimiento del glutatión en su forma reducida y este efecto se asocia con la disminución de glutatión oxidado. En un estudio previo, Rojas et al. (1996) demostraron la capacidad de la vitamina E de la dieta para incrementar el potencial antioxidante global y para mejorar el estado redox por el aumento de la relación GSH / GSSH en función del aporte de vitamina E. Sin embargo, no hay información en la que se estudie la influencia de las diferentes formas de la vitamina E en el sistema redox del glutatión. En el presente estudio, la adición de vitamina E natural en el agua de bebida de las cerdas y sus lechones (M-Sup_L-Sup) produjo un 20% y 25% de disminución en GSSH en comparación con el grupo de control después de los días 5 y 20 post-destete, respectivamente, mientras que el aumento de GSH fue de aproximadamente 40%. Por lo tanto se puede concluir que la suplementación con vitamina E natural en el agua de bebida produce un aumento en el sistema de defensa antioxidante.

VI.2.4.- Respuesta inmune de los lechones

Dado que el daño oxidativo podría afectar la supervivencia de las células y a la respuesta inmune, se midió la concentración de inmunoglobulinas de los lechones en suero (*Tabla V-4*) (IgM, IgA e IgG, como indicador de la respuesta humoral). En el caso de la IgM se observó un efecto del tiempo ($P=0,0042$) y una interacción tiempo*tratamiento ($P=0,0015$) de modo que en el día 5 los lechones del grupo M-Sup_L-Sup tienen mayor concentración de IgM en el suero, mientras que después de 20 días post-destete el valor más alto se encontró en el grupo M-Sup_L-Ctrol. Nemec et al. (1994) no observaron diferencias en el plasma de las cerdas y sus lechones en la concentración de inmunoglobulinas cuando se suplementaron con DL- α - tocoferol acetato durante la gestación [88 UI / kg] y durante la lactancia [220 UI / kg]. Asimismo, Lauridsen et al. (2011) encontraron que la suplementación del pienso con vitamina E natural no tuvo influencia en la respuesta

inmune [IgA y IgM] tras inoculación con *Escherichia E.* Por el contrario, otros autores (Babinszky et al, 1991) observaron que la suplementación con vitamina E (136 IU DL- α -tocoferol acetato / kg frente a 13 UI / kg) en pienso de cerdas, aumentó significativamente la respuesta inmune de su progenie. Del mismo modo, la suplementación con vitamina E en pienso (Fragou et al., 2004) o el aporte parenteral (Hidiroglou et al., 1995) a lechones mejoró el estatus inmunológico. En el presente estudio, la concentración de IgG e IgA no fue significativamente afectada por el tiempo y se mantuvieron más o menos sin cambios, mientras que la concentración de IgM disminuyó después del destete ($P = 0,0042$). Nemec et al. (1994) también observaron una caída en los niveles de IgM después del destete en grupos suplementados con vitamina E. Además, en el presente estudio la concentración de IgM de los grupos M-Ctrol_L-Ctrol y la L-Ctrol_M-Sup se incrementó a partir del día 5 hasta el día 20 mientras que en los otros disminuyeron ligeramente (interacción tratamiento x tiempo, $P = 0,0062$). De acuerdo con los resultados observados, se puede concluir que la suplementación con vitamina E natural a las cerdas y sus lechones desde el destete hasta el día 5 dio lugar a una concentración de IgM superior. La suplementación continua de lechones en agua de bebida puede reducir la concentración de IgM, siendo interesante la suplementación natural de la hembra para alcanzar los valores más altos de IgM.

VI.1.- Ensayo 2 y 3

Los datos del primer ensayo permiten concluir que la vitamina E natural aportada en el agua de bebida es una forma efectiva de administración tanto para madres como para lechones. Una pequeña suplementación con vitamina E natural (alrededor de 10-15% sobre el nivel de vitamina E sintética aportada en el pienso) produce un beneficio proporcionalmente muy superior. Además, esto ocurre incluso aunque el nivel de inclusión de vitamina E en el pienso sea elevado, pese a que podrían producirse fenómenos de competencia.

Otras conclusiones relevantes de este primer ensayo es que, pese al elevado nivel de aporte de vitamina E, tras el destete se produce un marcado descenso de la concentración de tocoferol en el suero de los lechones en todos los grupos y que el aporte de vitamina E a las madres durante la lactación es al menos tan importante como la suplementación tras el destete.

En el primer ensayo se estima que las madres consumían durante la lactación una cifra próxima a los 500 mg de acetato de α -tocoferol sintético/día y los lechones aproximadamente 30 mg/día. Como se indicó con anterioridad, esta situación existe en producción porcina, pero no es la única ni siquiera la más habitual. En muchas circunstancias los niveles aportados son los mínimos recomendados por el NRC o incluso levemente inferiores (alrededor de 150-200 mg/día para las madres y de 3 mg/d para los lechones). En los siguientes experimentos se decidió profundizar en las posibilidades de aportar la forma natural de vitamina E como alternativa a la forma sintética, pero trabajando en un nivel bajo de inclusión. Dada la importancia de la etapa de lactación puesta de manifiesto en el primer ensayo, se decidió realizar un primer ensayo con madres durante la etapa de lactación. En un ensayo posterior se combinaron los tratamientos a madres y lechones. En estos dos ensayos la orientación fue aportar un nivel bajo de vitamina E (equivalente al nivel de inclusión más bajo frecuentemente utilizado en la industria). El objetivo fue establecer las posibilidades de incluir vitamina E en forma

sintética como alternativa eficaz a la vitamina E natural. Dada la orientación similar de estos dos ensayos, se discuten conjuntamente.

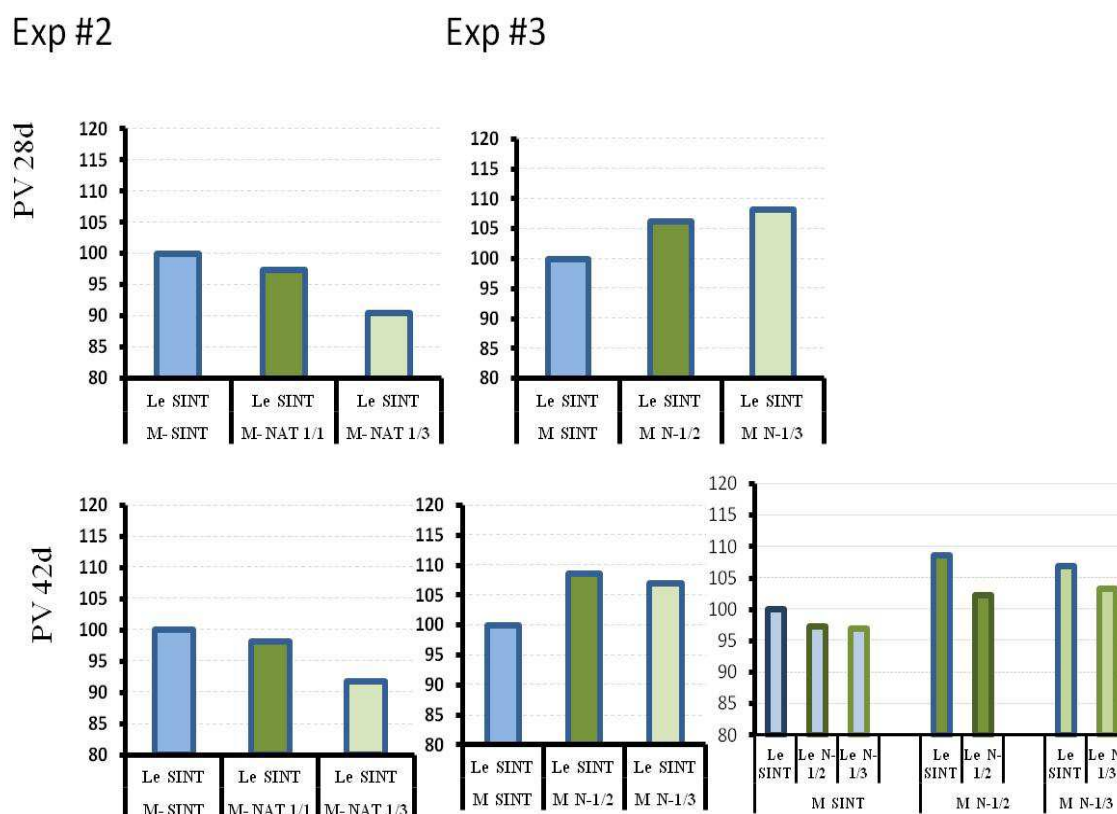
Para establecer las cantidades de vitamina E natural aportada en el agua de bebida se han realizado distintas aproximaciones experimentales en los que las relaciones entre los aportes de vitamina E sintética y natural fueron 1/1, 1/2, 1/3 (vitamina E natural en el agua: sintéticos en pienso) tratando de encontrar una equivalencia real entre ambas formas de vitaminas y los vehículos de administración que mantengan los valores de α -tocoferol en el suero de lechones. Estas proporciones se basan en los resultados del ensayo #1, así como en los trabajos de Wilburn et al., (2008), que encontraron una proporción de agua-alimento \leq 2:1 cuando utilizaron la forma acetilada (natural vs sintético).

VI.1.1.- Rendimientos productivos de lechones

En el segundo ensayo (*Tabla V-5*), no se observaron diferencias entre los lechones provenientes de cerdas que recibieron vitamina E sintética y los de cerdas suplementadas con 1/1 NAT, aunque se observaron tendencias en el IT ($P = 0,0878$) cuando se compararon los grupos SINT y 1/3-NAT a los 7 días post-destete. Estos resultados parecen sugerir que el aporte de vitamina E natural a la concentración más baja utilizada en estos ensayos (1/3 respecto al grupo que reciben la forma sintética) no proporcionaron la cantidad mínima de vitamina requerida para el correcto desarrollo de los lechones. Es preciso indicar, sin embargo que la orientación de los ensayos (con un alto componente de trabajo analítico en el laboratorio y un número limitado de replicas) hace que estos resultados deben ser considerados solo como orientativos, siendo preciso realizar ensayos, con una orientación zootécnica y un número mucho más elevado de unidades experimentales para poder extraer conclusiones definitivas.

En el tercer ensayo el aporte de vitamina E natural en el agua de bebida a las cerdas produjo un aumento del peso de los lechones al destete ($P = 0,0363$) y una tendencia hacia un mayor peso a los 39 días de edad ($P = 0,0759$) (*Tabla V-12*). Por otra parte, la suplementación con vitamina E natural en el agua de bebida de los lechones provocó una menor GMD ($P = 0,0145$) tras el destete y aumentó el índice de transformación IT ($P = 0,0409$) (*Tabla V-12*) cuando se comparó con el grupo control que recibió vitamina E sintética en el pienso. Por lo tanto, los lechones suplementados con 1:3 de vitamina E natural tuvieron la GMD más baja y el IT más bajo (*Ilustración VI-3* y *Tabla V-5*).

Ilustración VI-3 - Estudio comparativo del peso vivo (PV) al destete (28d) y a los 42 días de vida en el experimento 2 y 3. (Datos expresados en porcentaje sobre un valor de 100 para el grupo control)



Existe muy poca información en la literatura sobre el efecto de la suplementación con vitamina E natural en el agua de bebida sobre estos parámetros zootécnicos. Wilburn et al. (2008) no encontraron ningún efecto de la adición de vitamina E natural en el alimento o en agua de bebida sobre la GMD durante período post-destete, pero hasta donde sabemos no existe más información publicada al respecto. Otros autores (Horn et al., 2010), no encontraron en terneros diferencias cuando se compararon las formas natural o sintética de vitamina E.

VI.1.2.- Acumulación de tocoferol

Como se ha indicado detalladamente en la revisión bibliográfica de esta tesis doctoral, los días inmediatamente posteriores al destete se produce una marcada disminución en la concentración sérica de tocoferol en los lechones. Es por tanto una etapa especialmente crítica, donde los lechones se encuentran en el umbral de la deficiencia. A diferencia del primer experimento, en estos dos ensayos se trabaja con dosis cercanas o ligeramente por debajo de las recomendaciones establecidas por el NRC (1998) lo que permite trabajar en concentraciones próximas al límite inferior y por tanto cabe esperar altas deficiencias entre grupos.

En los ensayos # 2 y 3, las concentraciones de α -tocoferol en el suero y la leche para el grupo suplementado con la forma sintética fueron similares a los valores encontrados por otros autores con la suplementación próxima (Mahan et al., 2000). Los datos obtenidos en estos dos ensayos se muestran en la (*Ilustración VI-4* y *Ilustración VI-5*).

Ilustración VI-4 - Estudio comparado del efecto del aporte de α -tocoferol a las madres en la concentración de α -tocoferol ($\mu\text{g/ml}$) en el suero de las madres, en el calostro y en la leche (ensayos 2 y 3)

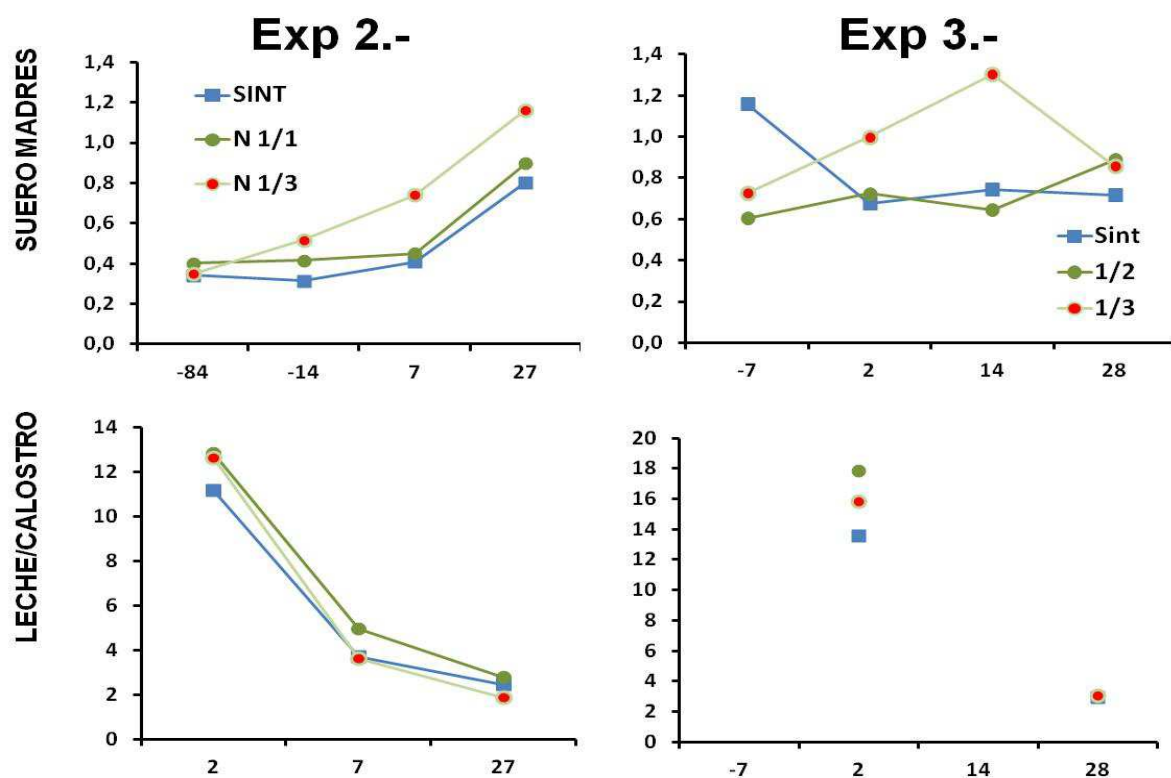
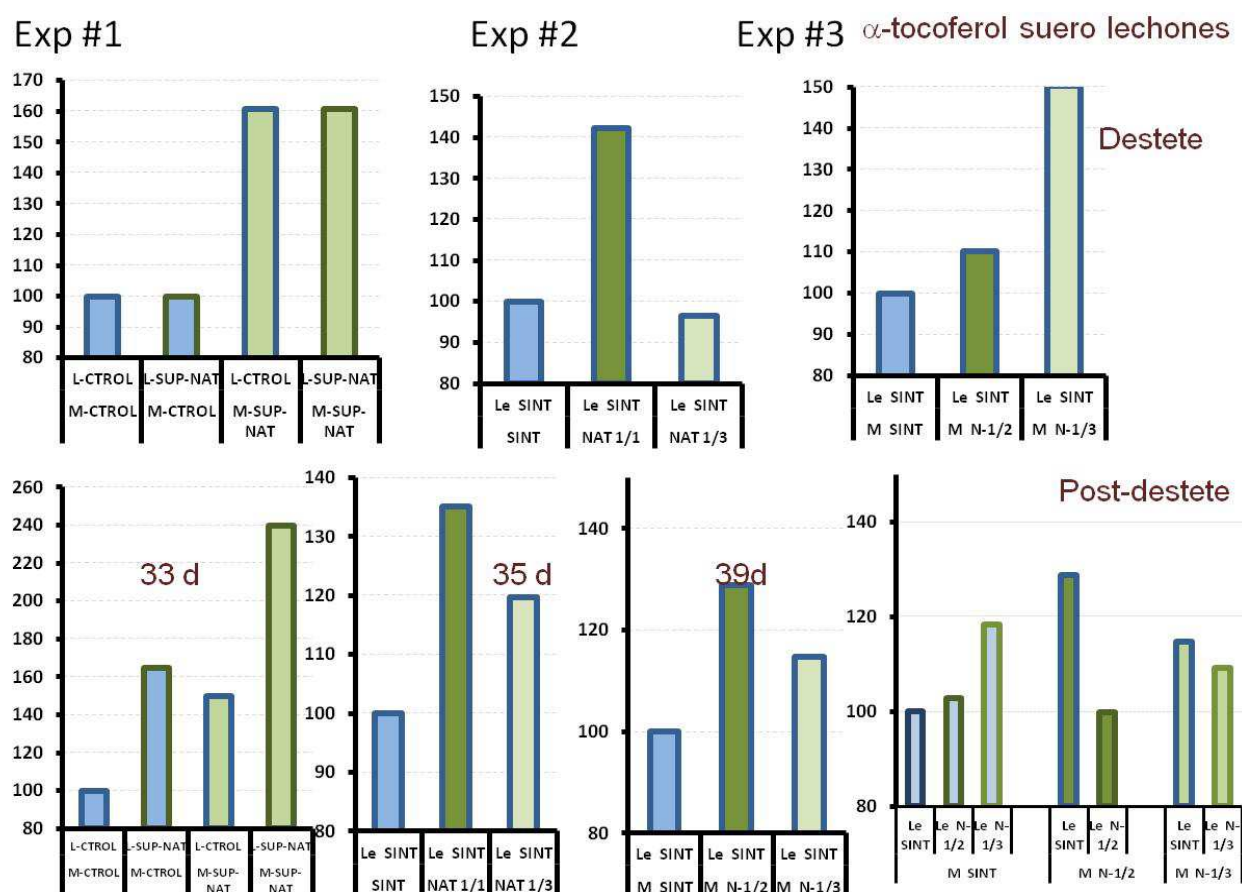


Ilustración VI-5 - Estudio comparado en los tres experimentos del aporte de α -tocoferol a las madres y lechones destetados en la concentración de α -tocoferol ($\mu\text{g/ml}$) en el suero de lechones en destete y post-destete (ensayos 2 y 3). (Datos expresados en porcentaje sobre un valor de 100 para el grupo control)



En el ensayo #2, en el que todos los grupos de lechones recibieron el mismo pienso después del destete, es interesante destacar que, los lechones de las cerdas suplementadas con la forma natural a baja dosis en el agua (1/3 NAT) no mostraron diferencias en la acumulación de α -tocoferol en suero frente a las cerdas que recibieron la forma sintética en el pienso. Por otra parte, los lechones procedentes de cerdas que recibieron una concentración igual a la sintética (1/1 NAT) (*Tabla V-6*) mostraron una mayor acumulación de α -tocoferol en suero que los de los grupos que recibieron la forma sintética ($P = 0,0056$)

o los de menor dosis de vitamina E natural (1/3) ($P = 0,0098$) en el momento del destete, manteniéndose la diferencia entre los grupos una semana después. Estos resultados parecen indicar que la relación de equivalencia entre la forma natural y sintética podría estar próxima a un valor de 1/3 (natural en agua: sintéticos en pienso). Por lo tanto, nuestros resultados coinciden con los encontrados por Wilburn et al. (2008) utilizando el ratio $\leq 2:1$ en el agua de bebida y pienso.

Por otro lado, la concentración de α -tocoferol en suero de lechones disminuye con el tiempo ($P = 0,0001$), sobre todo desde el destete hasta los 35 días post-destete (**Tabla V-6**). Estos datos son coincidentes con los resultados previos del ensayo #1 y con la literatura disponible (Moreira y Mahan, 2002; Lauridsen et al; 2002; Wilburn et al, 2008). Sin embargo, es interesante observar que esta disminución fue más intensa en los grupos con mayor concentración sérica de α -tocoferol al destete (**Tabla V-6**) ($P = 0,0004$, interacción tiempo*tratamiento). Por lo tanto, la concentración de α -tocoferol fue de 1,3 veces mayor en los lechones procedentes de cerdas que recibieron vitamina E natural en el agua de bebida (**Tabla V-6**) ($P = 0,074$) en comparación con los de cerdas que recibieron la forma sintética a los 7 días post-destete (35 días de edad).

En el ensayo #3, las cerdas suplementadas con vitamina E natural (D- α -tocoferol) en el agua de bebida a la dosis más baja (1/3 NAT) tuvieron concentraciones similares de α -tocoferol en suero a los 2, 14 y 28 días post-parto que aquellas suplementadas con la forma sintética en el pienso. Además, las cerdas que recibieron la vitamina E natural en el agua tendieron a tener valores más altos en el calostro que las que fueron suplementadas con la forma sintética en el pienso ($P = 0,0668$) (**Tabla V-6**), aunque en las muestras de leche al día 28 post-parto las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Dado que el consumo de agua fue mayor que el pienso, este resultado, en parte, indicaría que la forma natural alcohol se acumula mejor en agua que la forma sintética lo que se observó claramente en este segundo ensayo (**Tabla V-6**) cuando se utiliza el ratio 1/1 natural en agua: sintético en pienso. Por otra parte, como se esperaba, la concentración de tocoferol sérico se incrementó con el tiempo de suplementación (**Tabla V-3**) ($P = 0,0001$). Es interesante observar que el aumento fue mayor cuando las cerdas se suplementaron con la

vitamina E natural (**Tabla V-3**) (interacción tiempo*fuerza, $P = 0,0002$), principalmente con 1/3 NAT (interacción tiempo*dosis: $P = 0,011$). Otros autores han demostrado que la vitamina E natural se utiliza con más eficiencia que la sintética (Chung et al, 1992; Mahan et al, 2000; Yang et al, 2009) y que la suplementación resultaba ser más eficaz en el incremento de α -tocoferol en suero con suministro en agua que cuando se añadía en el pienso (Wilburn et al., 2008). Sin embargo, hasta donde sabemos, no existe información en la literatura en la que administrando una dosis baja de vitamina E obtengamos una mayor absorción y la acumulación en el suero. En el único estudio desarrollado en el agua de bebida, los autores (Wilburn et al. 2008) utilizaron dosis altas (50, 100, 150 ppm) de acetato de α -tocoferol y observaron que la acumulación depende de la enzima esterasa en las secreciones digestivas. Nuestros resultados podrían indicar que, en dosis próximas al mínimo, la absorción de una cantidad menor de la forma de alcohol micelizada administrada en el agua (1/3 NAT vs 1/2 NAT) podría ser más eficiente. Esta observación fue corroborada en el ensayo 2 en el que si bien las diferencias no alcanzaron el umbral de significación estadística ($P = 0,1705$) (**Tabla V-6**). En el momento del destete se encontraron niveles altos de tocoferol en calostro, leche, suero de cerdas y lechones ($P=0,076$). A los 39 días de edad (**Tabla V-13**), ensayo 3, ni la fuente o la dosis de suplementación a los lechones afectaron significativamente la acumulación de α -tocoferol en el suero, el músculo, la grasa subcutánea o el hígado. Sólo se encontró que los lechones suplementados con la forma alcohol natural micelizada en agua tendieron a tener una mayor acumulación de α -tocoferol en la grasa subcutánea que los suplementados con la forma sintética (**Tabla V-14**) ($P = 0,082$), a pesar de las dosis mucho más bajas administradas.

Por otra parte, es interesante observar que la fuente de suplementación de vitamina E en las cerdas podría tener alguna influencia sobre la acumulación de α -tocoferol en grasa de los lechones ($P= 0,159$) a los 39 días (**Tabla V-14**). No existe información en la literatura sobre los efectos de la suplementación de vitamina E de la cerda en el agua de bebida sobre los niveles de α -tocoferol en tejidos de lechones. De acuerdo con Lauridsen et al. (2002), la grasa y el cerebro de los lechones son los únicos tejidos en los que la concentración de α -

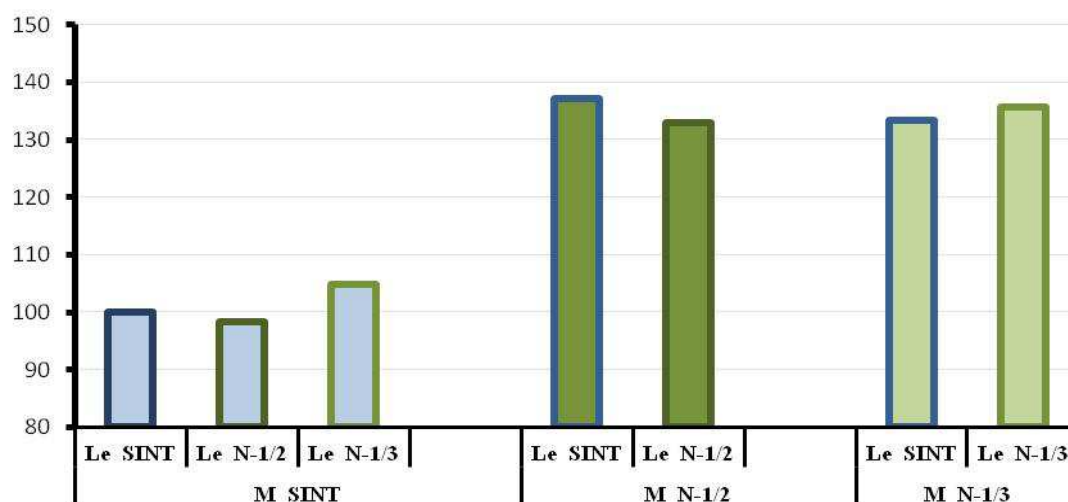
tocoferol aumenta entre el día 7 al 21 de lactancia. Otros autores han encontrado una tendencia a una mayor concentración de vitamina E en lechones que amamantaron cerdas que reciben altos niveles de acetato DL- α -tocoferol (Hidioglou et al, 1993; Pinelli-Saavedra et al, 2008) o el acetato D- α -tocoferol (Mahan et al., 2000) debido a la alta absorción en la leche de cerdas.

En el ensayo #3 (*Tabla V-14*) en la que no sólo las cerdas sino también los lechones recibieron vitamina E natural tras el destete, se encontró un incremento similar a los 39 días, lo que indica que probablemente sean necesarios dosis altas de suplementación a los lechones con vitamina E en agua de bebida para mantener los niveles de α -tocoferol en suero.

VI.1.2.1.- Distribución relativa de estereoisómeros de alfa-tocoferol

La importancia de la suplementación de los lechones a través de las cerdas fue más claro cuando se observa la distribución porcentual de los estereoisómeros α -tocoferol en el músculo (*Tabla V-15*). Los lechones procedentes de cerdas que recibieron la forma natural de vitamina E tuvieron mayor proporción de la forma RRR ($P = 0,0001$) y menor de las formas RRS ($P = 0,0001$), RSS ($P = 0,0001$) y RSR ($P = 0,0001$), a los 39 días de edad que los que provienen de cerdas suplementadas con la forma sintética. Lauridsen et al. (2002), han encontrado previamente que las cerdas lactantes y lechones incorporan de forma preferente la forma RRR que la forma all-rac- α -tocoferol en la leche, el plasma y los tejidos. Por otra parte, nuestros resultados indican que cuando se suministra una dosis baja de vitamina E, el tipo de vitamina E (Röhrle et al., 2010; Meglia et al., 2005) (natural vs sintética) aportada a las cerdas está más relacionada con el perfil de estereoisómeros de α -tocoferol en los lechones que el tipo de vitamina E aportada al propio lechón. Estos datos son de gran relevancia y enfatizan una vez más la gran importancia del aporte de vitamina E natural a través del aporte a las madres.

Ilustración VI-6 - Efecto del aporte de forma natural o sintética de alfa-tocoferol a la madre o el lechón destetado en la proporción del estereoisómero (%) RRR en el tejido muscular del lechón a los 39 días de vida (Experimento 3)

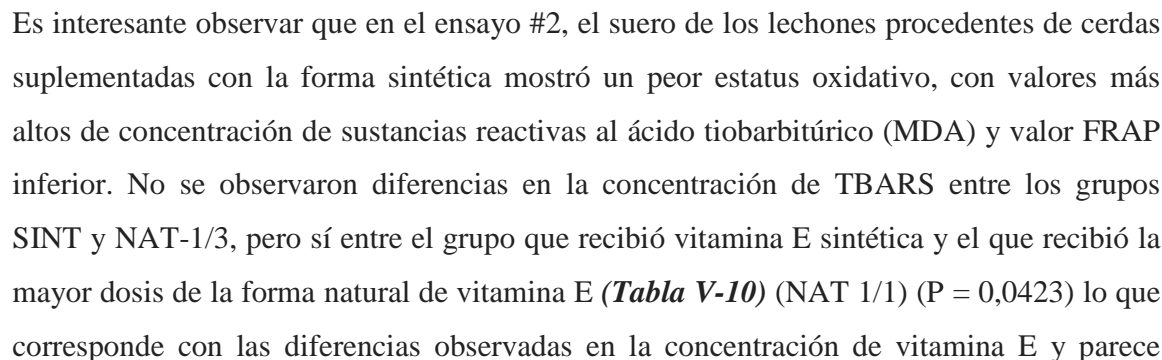


VI.1.3.- Estatus oxidativo de los lechones

Para evaluar el estrés oxidativo de los lechones tras el destete de acuerdo al tipo y la dosis aportada a las cerdas y los lechones, se determinó la concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, expresado como concentración de MDA) y la capacidad antioxidante reductora del hierro sérico (valor FRAP) (*Tabla V-10, Tabla V-20, Tabla V-21 y Tabla V-22*).

En la *Ilustración VI-7* se muestra de una forma comparada el efecto de los diferentes tratamientos (en los experimentos 2 y 3) en el estatus oxidativo de los lechones (estimado como valor FRAP o como concentración de malondialdehído en el suero. Para facilitar la comparación entre los dos experimentos, en la figura central se muestran los grupos del ensayo #3 que recibieron diferente alimentación en la etapa de madre, pero que en la etapa de lechón recibieron únicamente vitamina E en forma sintética.

Exp #3



indicar que la proporción 1/3 en el aporte de vitamina E a las cerdas es insuficiente para mantener el estado oxidativo de los lechones en vivo.

En el ensayo #3 es interesante señalar que nuevamente existe un marcado efecto del tipo de vitamina E aportada a las cerdas, como indican los valores del FRAP y la concentración de MDA en suero de los lechones ($P = 0,0091$) y ($P = 0,038$) respectivamente (*Tabla V-20* y *Tabla V-21*). Sin embargo, no se encontraron diferencias relacionadas con el tipo de vitamina E o la dosis aportada a los lechones en el estatus oxidativo de los mismos. Algunos autores han demostrado los efectos de la suplementación con vitamina E en pienso para controlar la concentración de TBARS (Hacisevki et al., 2012) y al mismo tiempo alcanzar valores altos del FRAP (Hamilton et al., 2000; Bardos et al. 2000; Benzie y Strain, 1999). Sin embargo, no existe ningún estudio en el que se evalúen estos parámetros en suero de lechones de acuerdo al tipo o la dosis de suplementación de vitamina E en el agua a lechones y/o a sus madres.

Es interesante observar que estos resultados están relacionados con lo observado para la proporción estereoisómeros de vitamina E, ya que las diferencias en la concentración de vitamina E en suero no se vieron afectadas significativamente. Brigelius-Flohe y Traber (1999), han encontrado actividades biológicas muy diferentes entre estereoisómeros que se puede explicar por las diferencias en la absorción basada en la prueba reabsorción gestación en ratas. Nuestros resultados indican, además, la importancia de estereoisómero RRR- α -tocoferol para controlar el estrés oxidativo. Como ya se ha indicado, este isómero es preferentemente incorporado por los lechones nacidos de cerdas suplementadas con formas naturales.

VI.1.4.- Respuesta inmune de los lechones

Puesto que el rendimiento productivo de lechones se vio afectado negativamente por la dosis más baja de la suplementación en el agua (1/3-NAT) de lechones o de sus madres, y teniendo en cuenta la relación entre algunas inmunoglobulinas sobre el crecimiento de los cerdos al destete (Pierce et al., 2005) y que la respuesta inmune de los cerdos jóvenes puede

verse comprometida cuando son sometidos a estrés, se decidió estudiar la concentración de inmunoglobulinas del suero de los lechones (IgM, IgA e IgG).

No existe información en la literatura sobre cómo se afecta la concentración de inmunoglobulinas con la suplementación de vitamina E en el agua de bebida. Nemec et al. (1994) no encontraron efecto en el plasma de las cerdas y sus lechones cuando los piensos se suplementaron con acetato DL- α -tocoferol durante la gestación [44 UI / kg] y durante la lactancia [220 UI / kg]. Así mismo, Bonette et al. (1990), usando cuatro niveles de vitamina E (entre 11 UI / kg y 550 UI / kg de pienso) no encontraron efecto en la inmunidad humoral y la mediada por células en lechones destetados a las cuatro semanas. Por el contrario, otros autores (Babinszky et al. 1991) observaron que dietas enriquecidas con vitamina E (136 IU acetato dl- α -tocoferol / kg frente a 13 UI / kg) utilizadas en pienso de cerdas aumentaron significativamente la respuesta inmune de su progenie. De la misma manera, la suplementación con vitamina E en pienso (Fragou et al., 2004) o el aporte parenteral (Hiridoglou et al., 1995) a lechones mejoró el estado inmunológico. En un estudio reciente, Bondo y Jensen (2011) encontraron que la administración oral de RRR- α -tocoferol a yeguas gestantes mejoró el título de inmunoglobulinas en potros.

En el presente estudio, la concentración de IgA (**Tabla V-24**) tendió a ser mayor ($P= 0,145$) a los 39 días en lechones suplementados con vitamina E natural en comparación con los suplementados con la forma sintética, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. En el segundo ensayo (**Tabla V-11**) la concentración de IgA en suero de lechones también se vio afectada por la dosis de la suplementación de vitamina E natural. Por lo tanto, los lechones provenientes de cerdas suplementadas con 1/3-NAT en el agua de bebida tuvieron una concentración inferior ($P= 0,00446$) de IgA a los 28, 35 y 42 días de edad en comparación con los que nacieron de cerdas suplementadas con 1/1-NAT. Estos resultados son coincidentes con los encontrados en la GMD de lechones y confirmaron que, a pesar de que dosis 3 veces más bajas de vitamina E natural en el agua de bebida administradas a las cerdas en comparación con la suplementación de la forma sintética producen similares concentraciones y estado oxidativo de vitamina E en suero lechones, el estado general del animal no es suficientemente bueno. Pierce et al. (2005) encontraron que

algunos parámetros productivos en los cerdos jóvenes, tales como el consumo de pienso y la tasa de crecimiento se ven afectados por un incremento de los niveles de concentración de inmunoglobulinas, lo que podrían ser debido a reducción de enfermedades intestinales post-destete impidiendo la adhesión de agentes patógenos. Es interesante recordar que los resultados del presente estudio fueron obtenidos cuando se utilizan dosis mínimas por debajo de las recomendaciones de NRC y que algunos autores (Peplowski et al, 1980) han sugerido que para optimizar la respuesta inmune de los cerdos se necesitan niveles de vitamina E 20 veces superiores.

Por otro lado, en el ensayo #2, la concentración de IgM e IgA se incrementaron con la edad de los lechones tras el destete ($P=0,0001$) (*Tabla V-11*), mientras que la de IgG se mantuvo sin cambios. Bourne (1973) encontró una evolución similar en concentraciones de inmunoglobulinas de cerdos jóvenes. Además, Nemec et al. (1994) encontraron una caída en el título de IgM de los lechones procedentes de cerdas sin suplementación de vitamina E en comparación con las que se suplementaron con 88 UI / kg, mientras que el descenso en la concentración de IgA se observó en todos los grupos.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII. **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Acuff, R. V., R. G. Dunworth, L. W. Webb, and J. R. Lane. 1998. Transport of deuterium-labeled tocopherols during pregnancy. *Am. J. Clin. Nutr.* 67(3): 459-464.
2. Alpsoy, L., and M. E. Yalvac. 2011. Key roles of vitamins A, C, and E in aflatoxin B-1-induced oxidative stress. *Vitamins and the Immune System.* 86: 287-305.
3. Alvarado, C., P. Alvarez, M. Puerto, N. Gausseres, L. Jimenez, and M. De la Fuente. 2006. Dietary supplementation with antioxidants improves functions and decreases oxidative stress of leukocytes from prematurely aging mice. *Nutrition.* 22(7-8): 767-777.
4. Ames, S. R. 1979. Biopotencies in rats of several forms of alpha-tocopherol. *J. Nutr.* 109(12): 2198-2204.
5. Archile-Contreras, A. C., and P. P. Purslow. 2011. Oxidative stress may affect meat quality by interfering with collagen turnover by muscle fibroblasts. *Food Res. Int.* 44(2): 582-588.
6. Atkinson, J., R. F. Epand, and R. M. Epand. 2008. Tocopherols and tocotrienols in membranes: A critical review. *Free Radical Biology and Medicine.* 44(5): 739-764.
7. Atkinson, J., T. Harroun, S. R. Wassall, W. Stillwell, and J. Katsaras. 2010. The location and behavior of alpha-tocopherol in membranes. *Molecular Nutrition & Food Research.* 54(5): 641-651.
8. Avellini, L., E. Chiaradia, and A. Gaiti. 1999. Effect of exercise training, selenium and vitamin E on some free radical scavengers in horses (*equus caballus*). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology.* 123(2): 147-154.
9. Babinszky, L., D. J. Langhout, M. W. A. Verstegen, L. A. Denhartog, P. Joling, and M. Nieuwland. 1991. Effect of vitamin-E and fat source in sows diets on immune-response of suckling and weaned piglets. *J. Anim. Sci.* 69(5): 1833-1842.

10. Bandyopadhyay, U., D. Das, D. Bandyopadhyay, M. Bhattacharjee, and R. K. Banerjee. 1999. Role of reactive oxygen species in mercapto-methylimidazole-induced gastric acid secretion and stress-induced gastric ulceration. *Curr. Sci.* 76(1): 55-63.
11. Barbosa, K. B. F., J. Bressan, M. A. Zulet, and J. A. Martinez. 2008. Influence of dietary intake on plasma biomarkers of oxidative stress in humans. *Anales Del Sistema Sanitario De Navarra.* 31(3): 259-280.
12. Bardos, L., N. Lukac, H. Lakner, P. Stastny, and K. Oppel. 2000. Antioxidant vitamin (retinoids, beta-carotene, tocopherol) and glycated protein (SEFA) levels and ferric reducing ability of plasma (FRAP) in newborn calves in the postpartal hours. *Magy. Allatorv. Lapja.* 122(9): 538-543.
13. BASF. 1993. Vitamins-one of the most important discoveries of the century. 5th Edition. BASF Corporation, Parsippany, New Jersey
14. Behrens, W. A., and R. Madere. 1987. Mechanisms of absorption, transport and tissue uptake of rrr-alpha-tocopherol and D-gamma-tocopherol in the white-rat. *J. Nutr.* 117(9): 1562-1569.
15. Behrens, W. A., J. N. Thompson, and R. Madere. 1982. Distribution of alpha-tocopherol in human-plasma lipoproteins. *Am. J. Clin. Nutr.* 35(4): 691-696.
16. Bender, D. A. 2003. Vitamin E: Tocopherol and tocotrienol. In: *Nutritional biochemistry of the vitamins.* 2^{da} (Eds). Cambridge: Cambridge University Press, cop. 2003. pp 109-130.
17. Benzie, I. F. F., and J. J. Strain. 1999. Ferric reducing antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Oxidants and Antioxidants, Pt a.* 299: 15-27.
18. Bondo, T., and S. K. Jensen. 2011. Administration of RRR-alpha-tocopherol to pregnant mares stimulates maternal IgG and IgM production in colostrum and

- enhances vitamin E and IgM status in foals. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 95(2): 214-222.
19. Bonnette, E. D., E. T. Kornegay, M. D. Lindemann, and C. Hammerberg. 1990. Humoral and cell-mediated immune-response and performance of weaned pigs fed 4 supplemental vitamin-E levels and housed at 2 nursery temperatures. *J. Anim. Sci.* 68(5): 1337-1345.
20. Bou, R., F. Guardiola, A. Grau, S. Grimpa, A. Manich, A. Barroeta et al. 2001. Influence of dietary fat source, alpha-tocopherol, and ascorbic acid supplementation on sensory quality of dark chicken meat. *Poult. Sci.* 80(6): 800-807.
21. Bourne, F. J. 1973. Immunoglobulin system of suckling pig. *Proc. Nutr. Soc.* 32(3): 205-215.
22. Brennan, L. A., G. M. Morris, G. R. Wasson, B. M. Hannigan, and Y. A. Barnett. 2000. The effect of vitamin C or vitamin E supplementation on basal and H₂O₂-induced DNA damage in human lymphocytes. *Br. J. Nutr.* 84(2): 195-202.
23. Brigelius-Flohe, R., and M. G. Traber. 1999. Vitamin E: Function and metabolism. *Faseb Journal.* 13(10): 1145-1155.
24. Buckley, D. J., P. A. Morrissey, and J. I. Gray. 1995. Influence of dietary vitamin-E on the oxidative stability and quality of pig meat. *J. Anim. Sci.* 73(10): 3122-3130.
25. Cadet, J., M. Berger, T. Douki, and J. L. Ravanat. 1997. Oxidative damage to DNA: Formation, measurement, and biological significance. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 131: 1-87.
26. Carrapiso, A. I., and C. Garcia. 2000. Development in lipid analysis: Some new extraction techniques and in situ transesterification. *Lipids.* 35(11): 1167-1177.
27. Chaudiere, J., N. Aguiñi, and J. C. Yadan. 1999. Nonenzymatic colorimetric assay of glutathione in the presence of other mercaptans. *Oxidants and Antioxidants, Pt a.* 299: 276-286.

28. Chung, Y. K., D. C. Mahan, and A. J. Lepine. 1992. Efficacy of dietary D-alpha-tocopherol and dl-alpha-tocopheryl acetate for weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 70(8): 2485-2494.
29. Clement, M., and J. M. Bourre. 1997. Graded dietary levels of RRR-gamma-tocopherol induce a marked increase in the concentrations of alpha- and gamma-tocopherol in nervous tissues, heart, liver and muscle of vitamin-E-deficient rats. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*. 1334(2-3): 173-181.
30. Clement, M., L. Dinh, and J. M. Bourre. 1995. Uptake of dietary rrr-alpha-tocopherol and rrr-gamma-tocopherol by nervous tissues, liver and muscle in vitamin-E-deficient rats. *Biochimica Et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism*. 1256(2): 175-180.
31. Csapo, J., T. G. Martin, Z. S. CsapoKiss, and Z. Hazas. 1996. Protein, fats, vitamin and mineral concentrations in porcine colostrum and milk from parturition to 60 days. *Int. Dairy J.* 6(8-9): 881-902.
32. Daza, A., A. Mateos, A. I. Rey, and C. J. Lopez Bote. 2005. Effect of feeding level during the period previous to free-range fattening on growth and carcass characteristics in Iberian pigs. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 3(4): 387-395.
33. Daza, A., C. J. Lopez Bote, and A. Rey. 2003. Influencia de la vitamina E sobre algunas características de la calidad de la carne de corderos ligeros. *Ganadería*. (22): 72-77.
34. Debier, C., and Y. Larondelle. 2005. Vitamins A and E: Metabolism, roles and transfer to offspring. *Br. J. Nutr.* 93(2): 153-174.
35. Debier, C., J. Pottier, C. Goffe, and Y. Larondelle. 2005. Present knowledge and unexpected behaviours of vitamins A and E in colostrum and milk. *Livest. Prod. Sci.* 98(1-2): 135-147.

36. Decker, E. A. y Hultin, H.O. 1992. Lipid Oxidation in Muscle Foods via Redox Iron. American Chemical Society Symposium Series, 500. A.J. St. Angelo, Ed. American Chemical Society, Washington D.C.
37. Diaz, O., C. Ros, A. Veiga, and A. Cobos. 2009. Including chestnuts and sugar beet pulp in diets for pigs: The effects on the quality of pork meat and the sensory properties of dry-cured sausage (chorizo gallego). *Journal of Muscle Foods*. 20(4): 449-464.
38. Diplock, A. T. 1983. The role of vitamin E in biological membranes. In: Porter, R & Whelan, J (Eds). *Biology of Vitamin E*, pp. 45-55. Pitman Books. London, UK, pp. 45-55.
39. Dong, G. Z., and J. R. Pluske. 2007. The low feed intake in newly-weaned pigs: Problems and possible solutions. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 20(3): 440-452.
40. Drotleff, A. M., and W. Ternes. 2001. Determination of RS,E/Z-tocotrienols by HPLC. *Journal of Chromatography a*. 909(2): 215-223.
41. Eiseman, J. L., Z. M. Yuan, N. D. Eddington, D. L. Sentz, P. S. Gallery, and M. J. Egorin. 1996. Plasma pharmacokinetics and urinary excretion of the polyamineanalogue 1,19-bis(ethylamino)-5,10,15-triazanonadecane in CD2F1 mice. *Cancer Chemother. Pharmacol*. 38(1): 13-20.
42. Farnworth, E. R., G. Butler, M. Math, and M. Hidirolou. 1995. Fetal pig vitamin-E status. *Nutr. Res*. 15(8): 1139-1147.
43. Formanek, Z., J. P. Kerry, D. J. Buckley, P. A. Morrissey, and J. Farkas. 1998. Effects of dietary vitamin E supplementation and packaging on the quality of minced beef. *Meat Sci*. 50(2): 203-210.
44. Fraga, M.J., Villamide, M.J. 2000. The composition of vitamin supplements in Spanish pig diets. *Pig News and information*. pp 67-72.

45. Fragou, S., K. Fegeros, E. Xylouri, A. Baldi, and I. Politis. 2004. Effect of vitamin E supplementation on various functional properties of macrophages and neutrophils obtained from weaned piglets. *Journal of Veterinary Medicine Series A-Physiology Pathology Clinical Medicine*. 51(4): 178-183.
46. Gallo-torres, H. E. 1990. The rat as a drug residue bioavailability model. *Drug Metab. Rev.* 22(6-8): 707-751.
47. Gassmann, B., and W. Kubler. 1996. Unsaturated fatty acids and vitamin E requirements. *Ernahrungs Umschau*. 43(5): 172-+.
48. Gordon, M. J., F. M. Campbell, and A. K. Dutta-Roy. 1996. Alpha-tocopherol-binding protein in the cytosol of the human placenta. *Biochem. Soc. Trans.* 24(2): 202S.
49. Guck, T., H. P. Sallmann, and H. Fuhrmann. 2000. Influence of increased vitamin A supplements on alpha-tocopherol and retinoids in serum and lipoproteins of shetland ponies. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition-Zeitschrift Fur Tierphysiologie Tierernahrung Und Futtermittelkunde*. 84(3-4): 95-101.
50. Guo, Q., B. T. Richert, J. R. Burgess, D. M. Webel, D. E. Orr, M. Blair et al. 2006. Effects of dietary vitamin E and fat supplementation on pork quality. *J. Anim. Sci.* 84(11): 3089-3099.
51. Guo, Y. M., Q. Tang, J. M. Yuan, and Z. R. Jiang. 2001. Effects of supplementation with vitamin E on the performance and the tissue peroxidation of broiler chicks and the stability of thigh meat against oxidative deterioration. *Anim. Feed Sci. Technol.* 89(3-4): 165-173.
52. Hacisevki, A., M. Torun, and A. Cengel. 2012. Effect of short-term alpha-tocopherol supplementation on biomarkers of oxidative stress and antioxidant defence in subjects with angina pectoris. *Oxidation Commun.* 35(1): 128-137.

53. Hacquebard, M., M. Vandenbranden, W. J. Malaisse, J. M. Ruyschaert, R. J. Deckelbaum, and Y. A. Carpentier. 2008. Vitamin E transfer from lipid emulsions to plasma lipoproteins: Mediation by multiple mechanisms. *Lipids*. 43(7): 663-671.
54. Halliwell, B. 1993. The role of oxygen radicals in human-disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis*. 23: 118-126.
55. Halliwell, B. 1994. Free-radicals and antioxidants - a personal view. *Nutr. Rev.* 52(8): 253-265.
56. Halliwell, B., M. L. Hu, S. Louie, T. R. Duvall, B. K. Tarkington, P. Motchnik et al. 1992. Interaction of nitrogen-dioxide with human plasma - antioxidant depletion and oxidative damage. *FEBS Lett.* 313(1): 62-66.
57. Hamilton, I. T. J., W. S. Gilmore, I. F. F. Benzie, C. W. Mulholland, and J. J. Strain. 2000. Interactions between vitamins C and E in human subjects. *Br. J. Nutr.* 84(3): 261-267.
58. Hernández, J. M. 2002. Nutrición vitamínica óptima en ganado porcino. In: Barroeta, A., Calsamiglia, S., Cepero, R., Lopez-Bote, C. J., & Hernández, J.M (Eds). *Óptima nutrición vitamínica de los animales para la producción de alimentos de calidad*. Pulso. Barcelona, España, pp. 29-75.
59. Herrero-Barbudo, M. C., F. Granado-Lorencio, I. Blanco-Navarro, B. Perez-Sacristan, and B. Olmedilla-Alonso. 2009. Applicability of an in vitro model to assess the bioaccessibility of vitamins A and E from fortified commercial milk. *Int. Dairy J.* 19(1): 64-67.
60. Hidirolou, M., E. Farnworth, and G. Butler. 1993. Vitamin-E and fat supplementation of sows and the effect on tissue vitamin-E concentrations in their progeny. *Reproduction Nutrition Development*. 33(6): 557-565.
61. Hidirolou, M., T. R. Batra, E. R. Farnworth, and F. Markham. 1995. Effect of vitamin-E supplementation on immune status and alpha-tocopherol in plasma of piglets. *Reproduction Nutrition Development*. 35(4): 443-450.

62. Hidirolou, N., R. Madere, L. R. McDowell, and P. L. Toutain. 2003. Influence of sources of dietary vitamin E on the maternal transfer of alpha-tocopherol to fetal and neonatal guinea pigs as determined by a stable isotopic technique. *Br. J. Nutr.* 89(4): 455-466.
63. Hidirolou, N., S. Hayward, W. Behrens, and R. Madere. 1997. Vitamin E levels in superficial and intra-abdominal locations of white adipose tissue in the rat. *J. Nutr. Biochem.* 8(7): 392-396.
64. Hoppe, P. P., and G. Krennrich. 2000. Bioavailability and potency of natural-source and all-racemic alpha-tocopherol in the human: A dispute. *Eur. J. Nutr.* 39(5): 183-193.
65. Hoppe, P. P., and K. Kraemer. 2002. Bioavailability and biopotency of vitamin E in humans: An ongoing controversy. Packer L., M. Traber, K. Kraemer and B. Frei, eds.
66. Horn, M. J., M. L. Van Emon, P. J. Gunn, S. D. Eicher, R. P. Lemenager, J. Burgess et al. 2010. Effects of maternal natural (RRR alpha-tocopherol acetate) or synthetic (all-rac alpha-tocopherol acetate) vitamin E supplementation on suckling calf performance, colostrum immunoglobulin G, and immune function. *J. Anim. Sci.* 88(9): 3128-3135.
67. Hosomi, A., K. Goto, H. Kondo, T. Iwatsubo, T. Yokota, M. Ogawa et al. 1998. Localization of alpha-tocopherol transfer protein in rat brain. *Neurosci. Lett.* 256(3): 159-162.
68. Huang, H. Y., and L. J. Appel. 2003. Supplementation of diets with alpha-tocopherol reduces serum concentrations of gamma- and delta-tocopherol in humans. *J. Nutr.* 133(10): 3137-3140.
69. Hughes, D. A. 1999. Effects of dietary antioxidants on the immune function of middle-aged adults. *Proc. Nutr. Soc.* 58(1): 79-84.

70. Iqbal, J., and M. M. Hussain. 2009. Intestinal lipid absorption. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 296(6): E1183-E1194.
71. Jensen, C., J. Guidera, I. M. Skovgaard, H. Staun, L. H. Skibsted, S. K. Jensen et al. 1997. Effects of dietary alpha-tocopheryl acetate supplementation on alpha-tocopherol deposition in porcine m psoas major and m longissimus dorsi and on drip loss, colour stability and oxidative stability of pork meat. *Meat Sci*. 45(4): 491-500.
72. Jensen, M., A. Lindholm, and J. Hakkarainen. 1990. The vitamin-E distribution in serum, liver, adipose and muscle tissues in the pig during depletion and repletion. *Acta Vet. Scand*. 31(2): 129-136.
73. Jensen, M., B. Essengustavsson, and J. Hakkarainen. 1988. The effect of a diet with a high or low content of vitamin-E on different skeletal-muscles and myocardium in pigs. *Journal of Veterinary Medicine Series A-Zentralblatt Fur Veterinarmedizin Reihe A-Physiology Pathology Clinical Medicine*. 35(7): 487-497.
74. Jensen, S. K., and C. Lauridsen. 2007. Alpha-tocopherol stereoisomers. *Vitamin E: Vitamins and Hormones Advances in Research and Applications*. 76: 281-308.
75. Jones, D. P., J. L. Carlson, V. C. Mody, J. Y. Cai, M. J. Lynn, and P. Sternberg. 2000. Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radical Biology and Medicine*. 28(4): 625-635.
76. Kanner, J., German, J.B. y Kinsella, J.E. 1987. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 25: 317-365.
77. Knarreborg, A., C. Lauridsen, R. M. Engberg, and S. K. Jensen. 2004. Dietary antibiotic growth promoters enhance the bioavailability of alpha-tocopheryl acetate in broilers by altering lipid absorption. *J. Nutr*. 134(6): 1487-1492.
78. Kronbrust, D.J. y Mavis, R.D. 1980. Relative susceptibility of microsomes from lung, heart, liver, kidney, brain and testes to lipid peroxidation: correlation with vitamin E content. *Lipids*, 15: 315-322.

79. Lakritz, L., J. B. Fox, J. Hampson, R. Richardson, K. Kohout, and D. W. Thayer. 1995. Effect of gamma-radiation on levels of alpha-tocopherol in red meats and turkey. *Meat Sci.* 41(3): 261-271.
80. Lauridsen, C. 1998. Antioxidative status in pigs and chickens following dietary alterations, with emphasis on skeletal muscles. Ph.D. Thesis. Danish Institute of Agricultural Sciences Research Centre Foulum.
81. Lauridsen, C. 2010. Evaluation of the effect of increasing dietary vitamin E in combination with different fat sources on performance, humoral immune responses and antioxidant status of weaned pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 158(1-2): 85-94.
82. Lauridsen, C., and S. K. Jensen. 2005. Influence of supplementation of all-rac-alpha-tocopheryl acetate preweaning and vitamin C postweaning on alpha-tocopherol and immune responses of piglets. *J. Anim. Sci.* 83(6): 1274-1286.
83. Lauridsen, C., E. Vestergaard, S. Hojsgaard, S. K. Jensen, and M. T. Sorensen. 2011. Inoculation of weaned pigs with *E. coli* reduces depots of vitamin E. *Livestock Science.* 137(1-3): 161-167.
84. Lauridsen, C., H. Engel, S. K. Jensen, A. M. Craig, and M. G. Traber. 2002. Lactating sows and suckling piglets preferentially incorporate RRR- over all-rac-alpha-tocopherol into milk, plasma and tissues. *J. Nutr.* 132(6): 1258-1264.
85. Lauridsen, C., J. Stagsted, and S. K. Jensen. 2007. n-6 and n-3 fatty acids ratio and vitamin E in porcine maternal diet influence the antioxidant status and immune cell eicosanoid response in the progeny. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 84(1-2): 66-78.
86. Lauridsen, C., M. S. Hedemann, and S. K. Jensen. 2001. Hydrolysis of tocopheryl and retinyl esters by porcine carboxyl ester hydrolase is affected by their carboxylate moiety and bile acids. *J. Nutr. Biochem.* 12(4): 219-224.

87. Lauridsen, C., S. Hojsgaard, and M. T. Sorensen. 1999. Influence of dietary rapeseed oil, vitamin E, and copper on the performance and the antioxidative and oxidative status of pigs. *J. Anim. Sci.* 77(4): 906-916.
88. Le Dividich, J., J. A. Rooke, and P. Herpin. 2005. Nutritional and immunological importance of colostrum for the new-born pig. *J. Agric. Sci.* 143: 469-485.
89. Lopez Bote, C. J. 2000. Dietary treatment and Quality characteristics of Mediterranean meat products. In: Decker E., Faustman C., & Lopez Bote C. J (Eds). *Antioxidants in Muscle Foods: Nutritional Strategies to Improve Quality*. Wiley Interscience. New York, USA, pp 345
90. López-Bote, C. J. 2002. Nutrición vitamínica óptima en ganado porcino. In: Barroeta, A., Calsamiglia, S., Cepero, R., López-Bote, C. J., & Hernández, J.M (Eds). *Óptima nutrición vitamínica de los animales para la producción de alimentos de calidad*. Pulso. Barcelona, España, pp. 29-75.
91. Lopez-Bote, C. J., B. Isabel, J. Ruiz, and A. Daza. 2003. Effect of vitamin E supplementation and partial substitution of poly- with mono-unsaturated fatty acids in pig diets on muscle, and microsome extract alpha-tocopherol concentration and lipid oxidation. *Archives of Animal Nutrition*. 57(1): 11-25.
92. Lucia Ferreira de Souza, V., R. Sergio Ferreira da Silva, C. Abercio da Silva, and E. Gasparino. 2007. Vitamin E on performance, carcass characteristics and quality of pig's cooked ham. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 42(4): 581-587.
93. Luciano, G., A. P. Moloney, A. Priolo, F. T. Roehrle, V. Vasta, L. Biondi et al. 2011. Vitamin E and polyunsaturated fatty acids in bovine muscle and the oxidative stability of beef from cattle receiving grass or concentrate-based rations. *J. Anim. Sci.* 89(11): 3759-3768.
94. Luciano, G., L. Biondi, R. I. Pagano, M. Scerra, V. Vasta, P. Lopez-Andres et al. 2012. The restriction of grazing duration does not compromise lamb meat colour and oxidative stability. *Meat Sci.* 92(1): 30-5.

95. Machlin, L.J. 1984. Vitamin E. En: Handbook of vitamins: Nutritional, Biochemical and Clinical Aspects, p. 99-145. Ed. L.J. Machlin, Marcel Dekker, Inc. Nueva York.
96. Mahan, D. C. 1991. Assessment of the influence of dietary vitamin-E on sows and offspring in 3 parties - reproductive-performance, tissue tocopherol, and effects on progeny. *J. Anim. Sci.* 69(7): 2904-2917.
97. Mahan, D. C. 2000. Effect of organic and inorganic selenium sources and levels on sow colostrum and milk selenium content. *J. Anim. Sci.* 78(1): 100-105.
98. Mahan, D. C., and J. L. Vallet. 1997. Vitamin and mineral transfer during fetal development and the early postnatal period in pigs. *J. Anim. Sci.* 75(10): 2731-2738.
99. Mahan, D. C., J. E. Jones, J. H. Cline, R. F. Cross, H. S. Teague, and A. P. Grifo. 1973. Efficacy of selenium and vitamin-E injections in prevention of white muscle disease in young swine. *J. Anim. Sci.* 36(6): 1104-1108.
100. Mahan, D. C., Y. Y. Kim, and R. L. Stuart. 2000. Effect of vitamin E sources (RRR- or all-rac-alpha-tocopheryl acetate) and levels on sow reproductive performance, serum, tissue, and milk alpha-tocopherol contents over a five-parity period, and the effects on the progeny. *J. Anim. Sci.* 78(1): 110-119.
101. Mallarino, E.G. 1992. Effect of dietary sunflower meal, fish meal, and vitamin E on turkeys uninfected and infected with stunting syndrome. Doctoral Thesis, Iowa State University, Ames, Iowa.
102. Malm, A., W. G. Pond, E. F. Walker, M. Homan, A. Aydin, and D. Kirtland. 1976. Effect of polyunsaturated fatty-acids and vitamin-E level of sow gestation diet on reproductive-performance and on level of alpha-tocopherol in colostrum, milk and dam progeny blood serum. *J. Anim. Sci.* 42(2): 393-399.
103. Meglia, G., S. K. Jensen, C. Lauridsen, and K. P. Waller. 2005. Alpha-tocopherol concentration and stereoisomer composition in plasma and milk from dairy cows fed natural or synthetic vitamin E around calving. Hogeveen H., ed.

104. Meier, S., S. A. Mjos, H. Joensen, and O. Grahl-Nielsen. 2006. Validation of a one-step extraction/methylation method for determination of fatty acids and cholesterol in marine tissues. *Journal of Chromatography a*. 1104(1-2): 291-298.
105. Metin, G., M. Kucur, F. Isman, M. Altan, M. Mengi, L. Cakar et al. 2010. The effect of regular training with vitamin E supplementation on the thioredoxine system in rats. *Trakya Universitesi Tip Fakultesi Dergisi*. 27(1): 74-78.
106. Meydani, S. N., and A. A. Beharka. 1998. Recent developments in vitamin E and immune response. *Nutr. Rev.* 56(1): S49-S58.
107. Monahan, F. J., J. I. Gray, A. Asghar, A. Haug, G. M. Strasburg, D. J. Buckley et al. 1994. Influence of diet on lipid oxidation and membrane-structure in porcine muscle microsomes. *J. Agric. Food Chem.* 42(1): 59-63.
108. Moreira, I., and D. C. Mahan. 2002. Effect of dietary levels of vitamin E (all-rac-tocopheryl acetate) with or without added fat on weanling pig performance and tissue alpha-tocopherol concentration. *J. Anim. Sci.* 80(3): 663-669.
109. Morrissey, P. A., D. J. Buckley, H. Sisk, P. B. Lynch, and P. J. A. Sheehy. 1996. Uptake of alpha-tocopherol in porcine plasma and tissues. *Meat Sci.* 44(4): 275-283.
110. Muir, W. I., A. J. Husband, and W. L. Bryden. 2002. Dietary supplementation with vitamin E modulates avian intestinal immunity. *Br. J. Nutr.* 87(6): 579-585.
111. Mustacich, D. J., R. S. Bruno, and M. G. Traber. 2007. Vitamin E. *Vitamin E: Vitamins and Hormones Advances in Research and Applications*. 76: 1-21.
112. Nassu, R. T., M. E. R. Dugan, M. Juarez, J. A. Basarab, V. S. Baron, and J. L. Aalhus. 2011. Effect of alpha-tocopherol tissue levels on beef quality. *Animal*. 5(12): 2010-2018.
113. Nemec, M., G. Butler, M. Hidioglou, E. R. Farnworth, and K. Nielsen. 1994. Effect of supplementing gilts diets with different levels of vitamin-E and

- different fats on the humoral and cellular-immunity of gilts and their progeny. *J. Anim. Sci.* 72(3): 665-676.
114. Njeru, C. A., L. R. McDowell, N. S. Wilkinson, S. B. Linda, L. X. Rojas, and S. N. Williams. 1994. Serum and tissue tocopherol in sheep after intramuscular injection and(or) dietary vitamin-E supplementation. *J. Anim. Sci.* 72(3): 739-745.
115. NRC. 1998 Nutrient Requirements of Swine. 10th Ed. National Research Council. National Academy Press. Washington DC.
116. O'Grady, M. N., F. J. Monahan, J. Bailey, P. Allen, D. J. Buckley, and M. G. Keane. 1998. Colour-stabilising effect of muscle vitamin E in minced beef stored in high oxygen packs. *Meat Sci.* 50(1): 73-80.
117. OSullivan, M. G., J. P. Kerry, D. J. Buckley, P. B. Lynch, and P. A. Morrissey. 1997. The distribution of dietary vitamin E in the muscles of the porcine carcass. *Meat Sci.* 45(3): 297-305.
118. Pekmezci, D. 2011. Vitamin E and immunity. *Vitamins and the Immune System.* 86: 179-215.
119. Peplowski, M. A., D. C. Mahan, F. A. Murray, A. L. Moxon, A. H. Cantor, and K. E. Ekstrom. 1980. Effect of dietary and injectable vitamin-E and selenium in weanling swine antigenically challenged with sheep red-blood-cells. *J. Anim. Sci.* 51(2): 344-351.
120. Pierce, J. L., G. L. Cromwell, M. D. Lindemann, L. E. Russell, and E. M. Weaver. 2005. Effects of spray-dried animal plasma and immunoglobulins on performance of early weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 83(12): 2876-2885.
121. Pinelli-Saavedra, A., A. M. C. de la Barca, J. Hernandez, R. Valenzuela, and J. R. Scaife. 2008. Effect of supplementing sows' feed with alpha-tocopherol acetate and vitamin C on transfer of alpha-tocopherol to piglet tissues, colostrum, and milk: Aspects of immune status of piglets. *Res. Vet. Sci.* 85(1): 92-100.

122. Pinelli-Saavedra, A., and J. R. Scaife. 2005. Pre- and postnatal transfer of vitamins E and C to piglets in sows supplemented with vitamin E and vitamin C. *Livest. Prod. Sci.* 97(2-3): 231-240.
123. Rey, A. I., A. Daza, C. Lopez-Carrasco, and C. J. Lopez-Bote. 2006. Feeding iberian pigs with acorns and grass in either free-range or confinement affects the carcass characteristics and fatty acids and tocopherols accumulation in longissimus dorsi muscle and backfat. *Meat Sci.* 73(1): 66-74.
124. Rey, A. I., C. J. Lopez-Bote, and R. S. Arias. 1997. Effect of extensive feeding on alpha-tocopherol concentration and oxidative stability of muscle microsomes from iberian pigs. *Animal Science.* 65: 515-520.
125. Rigotti, A. 2007. Absorption, transport, and tissue delivery of vitamin E. *Mol. Aspects Med.* 28(5-6): 423-436.
126. Rimbach, G., A. Fischer, J. Pallauf, and F. Virgili. 2002. Vitamin E and selenium effects on differential gene expression. Packer L., M. Traber, K. Kraemer and B. Frei, eds.
127. Roehrle, F. T., A. P. Moloney, A. Black, M. T. Osorio, T. Sweeney, O. Schmidt et al. 2011. Alpha-tocopherol stereoisomers in beef as an indicator of vitamin E supplementation in cattle diets. *Food Chem.* 124(3): 935-940.
128. Rojas, C., S. Cadenas, M. LopezTorres, R. PerezCampo, and G. Barja. 1996. Increase in heart glutathione redox ratio and total antioxidant capacity and decrease in lipid peroxidation after vitamin E dietary supplementation in guinea pigs. *Free Radical Biology and Medicine.* 21(7): 907-915.
129. Romero-Alvira, D., and E. Roche. 1998. The keys of oxidative stress in acquired immune deficiency syndrome apoptosis. *Med. Hypotheses.* 51(2): 169-173.

130. Sales, J., and V. Koukolova. 2011. Dietary vitamin E and lipid and color stability of beef and pork: Modeling of relationships. *J. Anim. Sci.* 89(9): 2836-2848.
131. Sanchez-Perez, A., M. M. Delgado-Zamarreno, M. Bustamante-Rangel, and J. Hernandez-Mendez. 2000. Automated analysis of vitamin E isomers in vegetable oils by continuous membrane extraction and liquid chromatography-electrochemical detection. *Journal of Chromatography a.* 881(1-2): 229-241.
132. SAS (1999) SAS Use's guide: Statistics. Statistical Analysis System Institute Inc, Cary, NC.
133. Shahidi, F., P. K. J. P. D. Wanasundara, and C. Hong. 1992. Antioxidant activity of phenolic-compounds in meat model systems. *ACS Symp. Ser.* 506: 214-222.
134. Shang, F., M. Lu, E. Dudek, J. Reddan, and A. Taylor. 2003. Vitamin C and vitamin E restore the resistance of GSH-depleted lens cells to H₂O₂. *Free Radical Biology and Medicine.* 34(5): 521-530.
135. Simpson, M. V., M. Hidiroglou, T. R. Batra, and X. Zhao. 1998. Reduced level of creatine kinase in the plasma of holstein cows supplemented with d-alpha-tocopherol acetate. *Canadian Journal of Animal Science.* 78(1): 147-149.
136. Steidinger, K. A. 2003. Meeting report: Xth international conference on harmful algae, st. pete beach, florida, october 21-25, 2002. *Protist.* 154(1): 11-16.
137. Sukhija, P. S., and D. L. Palmquist. 1988. Rapid method for determination of total fatty-acid content and composition of feedstuffs and feces. *J. Agric. Food Chem.* 36(6): 1202-1206.
138. Thakur, V., S. Morley, and D. Manor. 2010. Hepatic alpha-tocopherol transfer protein: Ligand-induced protection from proteasomal degradation. *Biochemistry (N. Y).* 49(43): 9339-9344.

139. Thomas, A. G., V. Miller, A. Shenkin, G. S. Fell, and F. Taylor. 1994. Selenium and glutathione-peroxidase status in pediatric health and gastrointestinal-disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 19(2): 213-219.
140. Tijburg, L. B. M., E. Haddeman, G. A. A. Kivits, J. A. Weststrate, and E. J. Brink. 1997. Dietary linoleic acid at high and reduced dietary fat level decreases the faecal excretion of vitamin E in young rats. *Br. J. Nutr.* 77(2): 327-336.
141. Torrey, S., E. L. M. T. Tamminga, and T. M. Widowski. 2008. Effect of drinker type on water intake and waste in newly weaned piglets. *J. Anim. Sci.* 86(6): 1439-1445.
142. Traber, M. G. 2007. Vitamin E regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Nutr.* 27: 347-362.
143. Traber, M. G., and H. Arai. 1999. Molecular mechanisms of vitamin E transport. *Annu. Rev. Nutr.* 19: 343-355.
144. Traber, M. G., and J. Atkinson. 2007. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine.* 43(1): 4-15.
145. Traber, M. G., G. W. Burton, and R. L. Hamilton. 2004. Vitamin E trafficking. *Vitamin E and Health.* 1031: 1-12.
146. Trefan, L., L. Buenger, J. Bloom-Hansen, J. A. Rooke, B. Salmi, C. Larzul et al. 2011. Meta-analysis of the effects of dietary vitamin E supplementation on alpha-tocopherol concentration and lipid oxidation in pork. *Meat Sci.* 87(4): 305-314.
147. Turner, K. E., K. E. McClure, W. P. Weiss, R. J. Borton, and J. G. Foster. 2002. Alpha-tocopherol concentrations and case life of lamb muscle as influenced by concentrate or pasture finishing. *J. Anim. Sci.* 80(10): 2513-2521.
148. Vanvleet, J. F. 1980. Current knowledge of selenium-vitamin-E deficiency in domestic-animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 176(4): 321-325.

149. Wenk, C., Leonhardt, M., & Scheeder, R. L. 2000. Monogastric nutrition and potential for improving muscle quality. In: Decker, E., Faustman C., & Lopez Bote C. J (Eds). *Antioxidants in Muscle Foods: Nutritional Strategies to Improve Quality*. Wiley Interscience. New York, USA, pp. 199-228.
150. Whittemore, C. 1993. Requirement for water, minerals and vitamins. In the sciences and practice of pig product. Pp 367-368.
151. Wilburn, E. E., D. C. Mahan, D. A. Hill, T. E. Shipp, and H. Yang. 2008. An evaluation of natural (RRR-alpha-tocopheryl acetate) and synthetic (all-rac-alpha-tocopheryl acetate) vitamin E fortification in the diet or drinking water of weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 86(3): 584-591.
152. Wiseman, H., and B. Halliwell. 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: Role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* 313: 17-29.
153. Wuryastuti, H., H. D. Stowe, R. W. Bull, and E. R. Miller. 1993. Effects of vitamin-E and selenium on immune-responses of peripheral-blood, colostrum, and milk leukocytes of sows. *J. Anim. Sci.* 71(9): 2464-2472.
154. Yamashita, K., S. Ikeda, Y. Iizuka, and I. Ikeda. 2002. Effect of sesaminol on plasma and tissue alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol concentrations in rats fed a vitamin E concentrate rich in tocotrienols. *Lipids.* 37(4): 351-358.
155. Yang, H., D. C. Mahan, D. A. Hill, T. E. Shipp, T. R. Radke, and M. J. Cecava. 2009. Effect of vitamin E source, natural versus synthetic, and quantity on serum and tissue alpha-tocopherol concentrations in finishing swine. *J. Anim. Sci.* 87(12): 4057-4063.
156. Yokota, T., K. Igarashi, T. Uchihara, K. Jishage, H. Tomita, A. Inaba et al. 2001. Delayed-onset ataxia in mice lacking alpha-tocopherol transfer protein: Model for neuronal degeneration caused by chronic oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98(26): 15185-15190.

157. Yu, B.P., 1994. Celular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Review*, 74: 139-162.

VIII. CONCLUSIONES

VIII. CONCLUSIONES

Los resultados encontrados en la presente Tesis Doctoral nos permiten obtener las siguientes conclusiones:

- 1.-La suplementación del agua de bebida de la cerda con vitamina E natural en su forma alcohol micelizada a bajas dosis (1/3 respecto a la forma sintética) produce una concentración similar de α -tocoferol en suero que la suplementación del pienso con la forma sintética.
- 2.-La cerda absorbe más eficientemente bajas concentraciones de la forma micelizada alcohol administrada en agua de bebida que concentraciones superiores en pienso cuando se encuentra suplementada por debajo de los requerimientos mínimos.
- 3.-La cerda suplementada con vitamina E natural (forma micelizada alcohol) en el agua de bebida tiende a tener valores superiores de α -tocoferol en el calostro que cuando es suplementada con la vitamina E sintética en pienso
- 4.-La suplementación de la cerda con vitamina E natural en el agua de bebida es una estrategia más interesante que la suplementación del lechón.
- 5.-La preferente incorporación por el lechón de los estereoisómeros RRR- α -tocoferol proporcionados por la forma natural de vitamina E, parecen ser responsables de la mayor capacidad antioxidante y menor stress oxidativo en el lechón nacido de una madre que ha sido suplementada con la forma natural en agua respecto a la utilización de la forma sintética en pienso.
- 6.-La equivalencia entre la suplementación con la forma natural en agua o sintética en pienso en la cerda se establece como 1/3 (all-rac-acetato de α -tocoferol en pienso: d- α -tocoferol en agua) para conseguir la equivalente concentración sérica y el status oxidativo del lechón, aunque dosis superiores son necesarias para mantener los rendimientos productivos y la respuesta inmune.

7.-Para controlar la drástica caída en la concentración de α -tocoferol sérica del lechón tras el destete y prevenir el stress oxidativo, así como mantener los rendimientos productivos y la respuesta inmune es necesaria a parte de la suplementación de la cerda, una suplementación del lechón con vitamina E a alta concentración puede ser alcanzada de forma eficiente con una simultanea suplementación de la forma natural en agua y la forma sintética en pienso.